Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. E. K i r c h

# Tierexperimentelle Untersuchungen zur Histochemie der kurzdauernden Nebennierenrinden-Belastungen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Edgar Engelmann

aus Leipzig

Würzburg 1956

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. E. K i r c h

# Tierexperimentelle Untersuchungen zur Histochemie der kurzdauernden Nebennierenrinden-Belastungen

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Edgar Engelmann

aus Leipzig

Würzburg 1956

Tag der mündl. Prüfung:
16. Juli 1956

Referent: Privatdozent Dr. med. Georg D h o m

Korreferent: Professor Dr. med. Eugen K i r c h

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Inhaltsverzeichnis


I. Einleitung 1

II. Material und Methodik 2

a) Tiermaterial 2
b) Belastungsversuche 2
c) Die durchgeführten histochemischen Reaktionen 3
d) Allgemeines über die Beurteilung der Färbemethoden 8
e) Die Einteilung in Belastungsstufen 9

III. Ergebnisse 9

1. Normale Histologie und Histochemie der Rattennebenniere 9
a) Die Gewinnung des Normaltieres 9
aa. Die bisher übliche Gewinnung 13
bb. Eigene Methode der Gewinnung 14
b) Eigene Befunde im Vergleich zur bisherigen Literatur 16
2. Der Akute Stress und die dabei auftretenden histochemischen Veränderungen in der Nebennierenrinde der Ratten 20
3. Eigene Untersuchungsreihen 22
a) Nicht gelungene Schußversuche 22
b) Akuter Schwimmversuch 23
c) Operative Entfernung einer Nebenniere 27
d) Psychische Belastung 32

IV. Deutung der erzielten Ergebnisse 36

V. Zusammenfassung 40

VI. Schrifttum 42

Bildanhang 45

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0034

# I. Einleitung

Seit der Entdeckung der Nebennieren (Eustachius 1563) und der ersten Vermutung einer "Inneren Sekretion" (de Bordeu 1755) ist die Bedeutung der Nebennierenrinde immer mehr in den Vordergrund der Forschung gerückt. Höhepunkte auf diesem Wege der Weiterentwicklung waren: Die Entdeckung der Lebenswichtigkeit der Nebenniere (Brown - Sequard 1856), die Vornahme der Rindeneinteilung durch Arnold (1866), die erste Vermutung von Nebennierenrindenveränderungen bei infektiösen Krankheiten (Vincent 1898), und schließlich die isolierte Entfernung des Nebennierenmarkes (Houssay und Lewis 1923), aus der die Lebensfähigkeit der Tiere bei erhaltener Rinde hervorging.

Die hormonell wirksamen Substanzen der Nebennierenrinde (NNR) wurden erstmals erfaßt von Swingle, Pfiffner und Hartmann (zit. nach Hoff), die mit einem Rindenextrakt den Ausfall der NNR kompensieren konnten. Aus diesem zunächst als "Cortin" bezeichneten Extrakt wurden inzwischen über 30 verschiedene Einzelwirkstoffe isoliert (Reichstein, Wintersteiner, Shopee u. a.). Butenandt klassifizierte alle diese Stoffe als Steroide und wies auf ihre chemische Verwandtschaft zu den Keimdrüsenhormonen hin. Nur 6 von diesen 30 Fraktionen zeigten Cortinwirksamkeit, d. h. sie waren in der Lage, operativ entfernte Nebennieren (NN) zu ersetzen.

Die Wichtigkeit eines histochemischen Nachweises von Steroiden in der NNR wird durch Selyes umfassende Arbeiten vom "Stress" besonders unterstrichen. "Stress", genau definiert als "Druck" oder "Belastung", bewirkt in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren Veränderungen histologisch und histochemisch nachweisbarer Art. Diese Veränderungen sind erfaßbar mit den verschiedensten Reaktionen: So werden Gesamtfettsubstanzen nachgewiesen mit der Sudanfärbung und Cholesterin durch das Phänomen der Doppelbrechung. Der histochemische Nachweis von Ketosteroiden wurde erstmals von Benett (1940) versucht. Während Benett - wie auch später andere wie Reichstein und Frazao - in seiner Methode die Ketogruppen mit einem Hydrazin reagieren ließ und als Ergebnis ein blaßgelbes Hydrazon bekam, verwandten Ashbel und Seligman (1949) an Stelle des Hydrazins ein Diazosalz und erreichten dadurch eine tiefblaue Anfärbung des nachzuweisenden Materials. Daß auch die fuchsinophile Substanz als Äquivalent sekretorischer Rindenaktivität

nicht ohne Bedeutung ist, wurde nach V i n e s auch von anderen Autoren gezeigt (Z i n s s e r , A. D. und H. H. Z i n s s e r , D h o m , L i e b e g o t t).

So stellt die Histochemie der NNR und ihre Beziehung zum Hormonhaushalt in Verbindung mit den verschiedensten Belastungen ("stresses") einen wichtigen Baustein der NNR-Forschung dar. Es wurden vielfach bei chronischen Belastungen (S e l y e und viele andere) histochemische Veränderungen nachgewiesen, nur wenige dagegen bei akuten und ganz akuten Belastungsarten (H e n i , G r u n e r und M a s t).

Ziel und Aufgabe dieser Arbeit soll es daher sein, die Histochemie der NNR weißer Ratten bei akuter Belastung in Gegenüberstellung zu bringen zu den histochemischen Gegebenheiten unbelasteter, sogenannter "Normaltiere".

Die parallele Durchführung von Steroidreaktion (A s h b e l und S e l i g m a n) und Nachweis der fuchsinophilen Substanz (V i n e s) sollen ergründen helfen, ob diese beiden Reaktionen geeignet sind, hormonelle Verschiebungen in der NNR nach Belastungen akuter Art anzuzeigen.

## II. Material und Methodik

### a) Tiermaterial

Zur Untersuchung kamen insgesamt 57 geschlechtsreife Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g. Davon waren 40 Stück männlich und 17 weiblich, wobei histochemisch in allen Versuchsreihen keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern festgestellt werden konnten. Die etwas größere Gesamtbreite der weiblichen Nebennierenrinde erscheint durch die bei der Auswertung verwendete Einteilung der Rinde in 5/5 genügend ausgeglichen. D e a n fand ebenfalls keine diesbezüglichen Unterschiede. Alle Tiere waren etwa gleichaltrig, aber nicht immer vom gleichen Wurf. Sie wurden gleichen Umwelts- und Ernährungsbedingungen ausgesetzt und stammen aus eigener Zucht.

Das gewonnene Material wurde in ameisensäurefreiem Formalin fixiert und baldigst zu Gefrierschnitten verarbeitet. Wir gingen dabei so vor, daß jeweils zunächst die linke Nebenniere verwendet, und der Rest dieser und die rechte NN zu Kontrollschnitten aufgehoben wurden. Kontrollschnitte wurden in reichem Maße zur Festigung der Befunde hergestellt.

### b) Belastungsversuche

Folgende Versuchsanordnungen, die später im einzelnen näher zu erläutern sein werden, wurden getroffen:

# I. Einleitung

Seit der Entdeckung der Nebennieren (Eustachius 1563) und der ersten Vermutung einer "Inneren Sekretion" (de Bordeu 1755) ist die Bedeutung der Nebennierenrinde immer mehr in den Vordergrund der Forschung gerückt. Höhepunkte auf diesem Wege der Weiterentwicklung waren: Die Entdeckung der Lebenswichtigkeit der Nebenniere (Brown - Sequard 1856), die Vornahme der Rindeneinteilung durch Arnold (1866), die erste Vermutung von Nebennierenrindenveränderungen bei infektiösen Krankheiten (Vincent 1898), und schließlich die isolierte Entfernung des Nebennierenmarkes (Houssay und Lewis 1923), aus der die Lebensfähigkeit der Tiere bei erhaltener Rinde hervorging.

Die hormonell wirksamen Substanzen der Nebennierenrinde (NNR) wurden erstmals erfaßt von Swingle, Pfiffner und Hartmann (zit. nach Hoff), die mit einem Rindenextrakt den Ausfall der NNR kompensieren konnten. Aus diesem zunächst als "Cortin" bezeichneten Extrakt wurden inzwischen über 30 verschiedene Einzelwirkstoffe isoliert (Reichstein, Wintersteiner, Shopee u. a.). Butenandt klassifizierte alle diese Stoffe als Steroide und wies auf ihre chemische Verwandtschaft zu den Keimdrüsenhormonen hin. Nur 6 von diesen 30 Fraktionen zeigten Cortinwirksamkeit, d. h. sie waren in der Lage, operativ entfernte Nebennieren (NN) zu ersetzen.

Die Wichtigkeit eines histochemischen Nachweises von Steroiden in der NNR wird durch Selyes umfassende Arbeiten vom "Stress" besonders unterstrichen. "Stress", genau definiert als "Druck" oder "Belastung", bewirkt in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren Veränderungen histologisch und histochemisch nachweisbarer Art. Diese Veränderungen sind erfaßbar mit den verschiedensten Reaktionen: So werden Gesamtfettsubstanzen nachgewiesen mit der Sudanfärbung und Cholesterin durch das Phänomen der Doppelbrechung. Der histochemische Nachweis von Ketosteroiden wurde erstmals von Benett (1940) versucht. Während Benett - wie auch später andere wie Reichstein und Frazao - in seiner Methode die Ketogruppen mit einem Hydrazin reagieren ließ und als Ergebnis ein blaßgelbes Hydrazon bekam, verwandten Ashbel und Seligman (1949) an Stelle des Hydrazins ein Diazosalz und erreichten dadurch eine tiefblaue Anfärbung des nachzuweisenden Materials. Daß auch die fuchsinophile Substanz als Äquivalent sekretorischer Rindenaktivität

nicht ohne Bedeutung ist, wurde nach V i n e s auch von anderen Autoren gezeigt (Z i n s s e r , A. D. und H. H. Z i n s s e r , D h o m , L i e b e g o t t).

So stellt die Histochemie der NNR und ihre Beziehung zum Hormonhaushalt in Verbindung mit den verschiedensten Belastungen ("stresses") einen wichtigen Baustein der NNR-Forschung dar. Es wurden vielfach bei chronischen Belastungen (S e l y e und viele andere) histochemische Veränderungen nachgewiesen, nur wenige dagegen bei akuten und ganz akuten Belastungsarten (H e n i , G r u n e r und M a s t).

Ziel und Aufgabe dieser Arbeit soll es daher sein, die Histochemie der NNR weißer Ratten bei akuter Belastung in Gegenüberstellung zu bringen zu den histochemischen Gegebenheiten unbelasteter, sogenannter "Normaltiere".

Die parallele Durchführung von Steroidreaktion (A s h b e l und S e l i g m a n) und Nachweis der fuchsinophilen Substanz (V i n e s) sollen ergründen helfen, ob diese beiden Reaktionen geeignet sind, hormonelle Verschiebungen in der NNR nach Belastungen akuter Art anzuzeigen.

## II. Material und Methodik

### a) Tiermaterial

Zur Untersuchung kamen insgesamt 57 geschlechtsreife Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 200 g. Davon waren 40 Stück männlich und 17 weiblich, wobei histochemisch in allen Versuchsreihen keine wesentlichen Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern festgestellt werden konnten. Die etwas größere Gesamtbreite der weiblichen Nebennierenrinde erscheint durch die bei der Auswertung verwendete Einteilung der Rinde in 5/5 genügend ausgeglichen. D e a n fand ebenfalls keine diesbezüglichen Unterschiede. Alle Tiere waren etwa gleichaltrig, aber nicht immer vom gleichen Wurf. Sie wurden gleichen Umwelts- und Ernährungsbedingungen ausgesetzt und stammen aus eigener Zucht.

Das gewonnene Material wurde in ameisensäurefreiem Formalin fixiert und baldigst zu Gefrierschnitten verarbeitet. Wir gingen dabei so vor, daß jeweils zunächst die linke Nebenniere verwendet, und der Rest dieser und die rechte NN zu Kontrollschnitten aufgehoben wurden. Kontrollschnitte wurden in reichem Maße zur Festigung der Befunde hergestellt.

### b) Belastungsversuche

Folgende Versuchsanordnungen, die später im einzelnen näher zu erläutern sein werden, wurden getroffen:

A. Zur Gewinnung von Normaltieren:
   1. Die bisher übliche Methode der Gewinnung.
   2. Eigene Methode der Gewinnung.

B. Zur Erzielung eines akuten Stress:
   1. Akuter Schwimmversuch.
   2. Entfernung einer NN durch Operation.
   3. Psychischer Stress.

c) Die durchgeführten histochemischen Reaktionen

Im folgenden Kapitel sollen die durchgeführten Färbemethoden besprochen werden, und zwar: Färbung nach A s h b e l und S e l i g m a n , Nachweis der fuchsinophilen Substanz (V i n e s), Sudanfärbung und Nachweis der doppeltbrechenden Substanzen.

1) Die Phenylhydrazinreaktion nach A s h b e l und S e l i g m a n :

Der histochemische Nachweis von Ketosteroiden wurde zuerst von B e n e t t (1940) versucht. Der von B e n e t t angegebenen Reaktion liegt die Bildung eines Hydrazons durch Reaktion einer Ketogruppe mit einem aromatischen Hydrazin zugrunde, wobei das entstehende Hydrazon als unlösliche Verbindung in loco liegen bleibt und mikroskopisch nachzuweisen ist. Neben anderen Reaktionen auf gleicher Basis und Modifikationen (D e m p s e y und W i s l o c k i u. a.) wurde von A s h b e l und S e l i g m a n (1949) mit der NAHD-Reaktion (2,3 naphtoic acid hydracid diazo blue-Reaktion) gearbeitet. A s h b e l und S e l i g m a n verwandten nun hierbei an Stelle des Hydrazons ein Diazosalz und bekamen dadurch eine deutliche blaue Färbung der aktiven Ketogruppen, die sich vorher nur blassgelb-orange darstellten. F e l d m a n (1950) kritisierte die Spezifität der Reaktion und wies nach, daß auch Aldehyde dabei reagieren, daher nicht Ketosteroide, sondern lediglich aktive Carbonylgruppen nachgewiesen werden. Eine genaue Kritik über die Spezifität findet sich bei G o m o r i , der ebenso wie auch B a c h m a n n und F e l d m a n der Meinung ist, daß letzten Endes nur die aktiven Carbonylgruppen nachgewiesen werden. Die Meinung G o m o r i s , daß es sich bei dem nachgewiesenen Material um Aldehyde handelt, wurde erst kürzlich bestätigt durch Untersuchungen von D e a n : Nachdem an unfixiertem Material keine Reaktion gefunden werden konnte, extrahierte Verfasserin sowohl unfixiertes als auch fixiertes Material und verglich die Menge der chemisch nachweisbaren Stoffe miteinander. Dabei stellte sie fest, daß bei dem fixierten Material der Aldehydspiegel ganz wesentlich an-

gestiegen war, während die Jodzahl (als Nachweis ungesättigter Lipoide) absank. Die Entstehung der Aldehyde erklärt Verf. durch Autoxydation höherer Lipoide, da bei Hinzugabe eines Antioxydationsmittels die Erhöhung der Aldehyde ausblieb. A s h b e l und S e l i g m a n versuchten später die Spezifität dadurch höherwertig zu gestalten, daß sie leicht alkohollösliche Substanzen durch Einführen von Alkohol in die Reaktionsreihe beseitigten. Hierdurch gehen jedoch höchstwahrscheinlich - wenn auch in geringem Umfange - Ketosteroide verloren. Eine genaue Wiedergabe der Originalmethode dieser Reaktion findet sich bei D h o m . Aufgrund der von uns durchgeführten Untersuchungen ergaben sich folgende Besonderheiten: Bei Fixierung mit üblichem, nicht ameisensäurefreien Formalin fällt die Färbung zunächst völlig negativ aus, jedoch kann das Material durch längeres Spülen in Neutralformalin gewissermaßen "umfixiert" und reaktionsfähig gemacht werden. In unseren Fällen dieser Art wurde 3 - 4 mal täglich das Formalin (während 4 Wochen) gewechselt. Man kann so auch noch Material untersuchen, welches eventuell schon vor langer Zeit gewonnen und falsch fixiert wurde.

Weiterhin wurde festgestellt, daß manchmal bei zunächst negativen Fällen die später durchgeführten Kontrollversuche positiv wurden. In mehreren Fällen war dabei sogar zu beobachten, daß die Intensität der Reaktion mit zunehmender Fixationszeit immer größer wurde. Nur wenige Fälle blieben auch noch nach mehreren Wochen ganz negativ. Dabei muß erwähnt werden, daß gewonnenes Material niemals länger als 24 Stunden bis zur ersten Verarbeitung und Schnittanfertigung aufbewahrt wurde. H. W. D e a n konnte zeigen, daß die Reaktion an unfixiertem Material stets negativ ist. Die Bedeutung dieses Nachweises ist jedoch nach Verf. dadurch nicht in Frage gestellt, da durch Belastungen (Hypophysektomie) Veränderungen im Ausfall der Reaktion auftreten. Verf. wies durch chemische Untersuchungen nach, daß es durch die Fixierung in Folge Autoxydation zur Bildung von Aldehyden kommt, die dann positive Reaktion geben (s. o.).

Das Auswaschen in Wasser nahmen wir sowohl als 24-stündige Dauerspülung, als auch über mehrere Stunden hindurch anhaltende Wechselspülung vor. Irgendwelche Unterschiede in verschieden gespülten Teilen eines Organs konnten nicht festgestellt werden. Auf die genaue Einhaltung des vorgeschriebenen Pufferwertes wird bereits in der Originalarbeit von A s h b e l und S e l i g m a n hingewiesen.

Bei der Endphase der Reaktion ergeben sich bemerkenswerte Beobachtungen. Zunächst wurde festgestellt, daß Stufenschnitte manchmal ganz verschiedene Endresultate ergeben, d. h. Schnitte des

gleichen Organs, die in der Schnittserie aufeinanderfolgen, zeigen einesteils ganz charakteristische Gruppierung positiver Zellen, anderenteils sind die darauffolgenden, völlig gleichbehandelten negativ und zeigen lediglich eine diffuse, leichte Gelbfärbung. Diese Gelbfärbung, die auch manchmal einen mehr bräunlichen Ton annimmt, deutet nach A s h b e l und S e l i g m a n auf einen nicht eingehaltenen Wert des Puffers hin. Dennoch ist eben verwunderlich, daß andere Schnitte, die durch die gleiche Färbereihe gegangen sind, die erwartete Blaufärbung zeigen. Aufgrund dieser Erfahrung haben wir niemals nur einen oder 2 Schnitte, sonderns stets mindestens 5 bis 6 dieser Reihe unterworfen. Die Ergebnisse waren häufig different. Bei Beobachtung der Reaktion hatte man den Eindruck, daß diejenigen Schnitte, die direkt vom zugegossenen Echt-Blausalz getroffen wurden, am stärksten positiv ausfielen, während die entfernter liegenden Schnitte auch bei sofortigem Umrühren nur schwache oder gar keine Reaktion zeigten.

Es wurden verschiedene Variationen ausprobiert, um diese Ungleichheiten zu kompensieren und zu beseitigen: Wir brachten die Schnitte in einen hohen, sehr schmalen Glaszylinder, um ein gleichmäßiges Auftreffen der Farblösung auf die Schnitte zu erreichen. Wir ließen die Schnitte für etwa 15 Minuten in der Puffer-Alkohol-Lösung liegen und gaben den ungelösten Farbstoff dazu. All diese und manche andere Versuche blieben jedoch ohne Erfolg und die Färbedifferenzen ließen sich nicht beseitigen. Es wurden daher stets mindestens fünf (meistens mehr) Schnitte eines Organs gleichzeitig gefärbt und der mittlere positive Wert als Endresultat verwendet. Dies erscheint erlaubt unter der Voraussetzung, daß man die völlig ungefärbten, bzw. gelb-braun gefärbten Schnitte als technisch bedingte Kunstprodukte wertet und bei der Feststellung der Endresultate unberücksichtigt läßt.

Im ganzen kann gesagt werden, daß die Reaktion nach A s h b e l und S e l i g m a n sehr empfindlich ist, und höchstwahrscheinlich schon eine kleine Unreinheit eines dazu benutzten Gefäßes (z.B. Waschpulverrest an einem Trockentuch) den Pufferwert ändern und die Reaktion zunichte machen kann.

2) <u>Der Nachweis der fuchsinophilen Substanz nach V i n e s :</u>

Im Jahre 1933 entdeckte V i n e s eine besondere Art von Zellanfärbungen durch Ponceau-Fuchsin. Er untersuchte die NN von Patienten mit virilisierenden Erkrankungen. Es ergab sich, daß in 34 von 36 Fällen die V i n e s - Färbung positiv war, während sie in Kontrollversuchen stets negativ ausfiel. Auch konnte V i n e s in 5 Fällen von NN-Ca mit Virilisierungserscheinungen fuchsinophile Substanz nachweisen. Die stärkste Anfärbung fand sich im Bereich der Zona reticularis,

dann in der Fasciculata und am wenigsten schließlich in der Glomerulosa. Weiterhin finden sich fuchsinophile Granula bei Embryonen beiderlei Geschlechts, und zwar bei männlichen Feten zwischen der 9. und 20. Woche, bei weiblichen Feten zwischen der 11. und 15. Woche, später hingegen nicht mehr (V e r z à r). D h o m zeigt dagegen in neueren Untersuchungen, daß fuchsinophile Substanzen während der ganzen Fötalzeit und auch in der Neugeburtsperiode vorkommen.

Die von V i n e s aufgestellte Theorie, es handele sich bei dem fuchsinophilen Material um ein männliches Sexualhormon, wurde bezüglich der Methodik der Reaktion stark angegriffen, insbesondere von B e n e t t . B o u r n e ist der Meinung, es handelt sich dabei um Mitochondrien, da zweifellos starke Parallelen im Reaktionsmodus beider Substanzen bestehen: Beide lassen sich nur nach Vorbehandlung mit Kaliumbichromatbeizung darstellen, werden durch Alkohol- oder Säurebehandlung zerstört und sind durch Eosin nicht erfaßbar. Z i n s s e r, A. D. und H. H. Z i n s s e r erwähnen in einer neueren Arbeit, daß die eigentlichen fuchsinophilen Granula gegen Säuren etwas resistenter sind als die Mitochondrien. Verff. untersuchten auch Gewebe außerhalb der NN und fanden Korrelationen der fuchsinophilen Granula mit der Phenylreaktion, dies besonders in den interstitiellen Hodenzellen und corpora lutea. B l a c k m a n stellte außerdem fest, daß man positive Ergebnisse im Pankreasgewebe, in der Muskulatur und in den Tubulusepithelien der Niere bekommt. Vielfach liegt fuchsinophiles Material außerhalb der Carbonyl-positiven Lokalisationen (Z i n s s e r), doch wurden auch gemeinsame Lokalisationen gesehen und daraus erneut auf Zusammenhänge zwischen den aktiven Carbonylgruppen der NAHD- (und anderer) Reaktion und der fuchsinophilen Substanz vermutet. D h o m weist auf das umgekehrt proportionale Verhalten beider Substanzen im Bereich der Hiluszellen hin. Alle diese Befunde lassen Zusammenhänge zwischen Carbonyllipoiden und V i n e s - Substanz vermuten und machen sie wahrscheinlich. Nach L i e b e g o t t handelt es sich bei der fuchsinophilen Substanz um den färberisch erfaßbaren Eiweißteil der als Steroid-Eiweißkomplex abgegebenen Rindenhormone.

Die Reaktion wurde von uns als Parallelfärbung an Gefrierschnitten durchgeführt. Damit ist eine Abweichung von der Originalmethode gegeben, die Paraffinschnitte zum Ziel hat. Z i n s s e r , A. D. und H. H. Z i n s s e r jedoch führten ihre Untersuchungen an Gefrierschnitten durch und bekamen völlig analoge Ergebnisse.

Die Durchführung der Färbung erfolgt ohne große technische Schwierigkeiten und ohne die bei der NAHD-Reaktion auftretenden Feh-

lerquellen (Methodik ausführlich bei S t e e g e).

3) Die Reaktion mit Sudanfarbstoffen:

"Sudanfarbstoffe färben nahezu alle im Körper vorkommenden Fettstoffe" (R o m e i s). Diese Feststellung des Verf. charakterisiert die Sudanfärbung als breitbasiges Fettnachweismittel und läßt daher kein Urteil über irgendwelche Gruppenzugehörigkeit zu. Von den verschiedenen zu dieser Gruppe gehörenden Nachweisstoffen erscheint nach R o m e i s die von ihm angegebene (1929 erstmalig, 1936 neueren Farbzusammensetzungen angepaßt) "Kolloidale Sudanlösung" am besten und intensivsten, da sie alle Fettröpfchen bis zu "mikroskopischer Kleinheit" erfaßt. Diese Methode wurde zunächst als Grundlage von uns angewendet, obwohl ihre Durchführung recht umständlich ist. Probeweise fertigten wir Parallelschnitte an, die mit Sudan-Schwarz-B behandelt waren und konnten sowohl bezüglich der Färbeintensität als auch der Reaktionsausdehnung weitgehende Übereinstimmung erzielen. Wir verwendeten daher nur noch die von L i s o n (1934) angegebene Sudan-Schwarz-B-Methode. Auch ist hier der Vorteil eines wesentlich kräftigeren Kontrastes zwischen ungefärbtem und gefärbtem Gewebe gegeben.

Bei der Färbeanordnung, die sehr einfach durchzuführen ist, ist lediglich die Färbezeit zu beachten. Bei zu langer Färbezeit fällt sonst die Reaktion so intensiv aus, daß feinere Tröpfchen von grösseren vollständig überdeckt werden und dadurch das Feinbild der Fettverteilung nicht mehr recht zu beurteilen ist. Färbt man bei frischer Lösung nicht länger als 5 - 7 Minuten, so bekommt man ein nicht zu intensives, aber doch deutlich auszudifferenzierendes Bild.

Über den Einfluß des Fixierungsmittels sind mehrere Arbeiten bekannt geworden. Mit nahezu vollkommener Übereinstimmung der Autoren (D o l f i n i 1928) soll die Sudanfärbung dadurch nicht beeinträchtigt werden.

Die Sudanfärbung gab uns einen Überblick über den Gesamtfettgehalt der NNR. Die Reaktion diente als Grundlage dem Vergleich mit den oben angeführten speziellen Färbungen.

4) Die Polarisation:

Um einen Überblick über die Menge an Cholesterinstoffen zu bekommen, die sich in der normalen und der belasteten NNR der Ratte findet, untersuchten wir das Phänomen der Doppelbrechung dieser Substanzen im Polarisationsmikroskop. Bei der den Cholesterinstoffen heute im allgemeinen zuerkannten Rolle als Ausgangsstoff zur Hormonbildung erscheint die Beobachtung der doppeltbrechenden Substanzen in der NNR

als sehr wichtig. Viele Untersucher (W e a v e r , N e l s o n , D e a n , S h a w u. a.) gehen sogar soweit, daß sie aus dem Vorhandensein von doppeltbrechender Substanz den Aktivitätszustand der NNR ablesen. Hierin stimmen sie mit B e n e t t (1940) im wesentlichen überein.

Für die Durchführung dieser Untersuchungen verwendeten wir Gefrierschnitte, die aus aqua dest. kommend lediglich 5 Minuten mit Haemalaun gefärbt und dann in Glyzerogel eingedeckt wurden.

d) Allgemeines über die Beurteilung der Färbemethoden

Die Beurteilung der einzelnen Schnitte wurde vorgenommen mit Hilfe einer Einteilung der NNR in fünf gleichgroße Teile (5/5). Dabei erkannten wir der Zona fasciculata gewissermaßen die drei mittleren Fünftel zu, während ein äußeres Fünftel der Zona glomerulosa und ein inneres Fünftel der Zona reticularis entspricht. Diese Einteilung setzt allerdings voraus, daß "transformatorische" Veränderungen im Sinne T o n u t t i s (progressiver oder regressiver Art) nicht vorhanden sind, eine Bedingung, die in allen unseren Fällen erfüllt wurde. So bezeichneten wir den Sudanschnitt eines unbelasteten Tieres als 4-5/5 positiv, wobei die Stärke der sudanophilen Substanz nach innen zu abnimmt und sich im Bereich der Zona reticularis - also dem fünften Fünftel - allmählich verliert. Ebenso wurden die in ihrer Intensität etwas hinter den Sudanschnitten stehenden Haematoxylinschnitt bezüglich ihrer Doppelbrechung beurteilt.

Besonders zweckmäßig erscheint diese Einteilung jedoch bei der NAHD-Reaktion, da hier die Anfärbung meist ziemlich gleichmäßig ist, jedoch stark in der Ausdehnung schwankt. Hierbei schwankte die Rindenpositivität zwischen unter einem Fünftel (z. B. gering in der Zona glomerulosa) und 4-5/5 (bis in die Zona reticularis hinein).

Die Fuchsinophilie ist dagegen mit einer 5/5-Einteilung nicht zu erfassen. Fuchsinophile Substanz erscheint im Gegensatz zu den anderen zonen-förmig auftretenden Reaktionen in Zellgruppen oder in Einzelzellen. Hier muß die ganze Rinde abgesucht werden, und zwar an Hand mehrerer Schnitte, und die Summe der Fuchsinophilie der einzelnen Blickfelder beurteilt werden. Als Stärkegrade der mit der V i n e s - Färbung nachgewiesenen fuchsinophilen Substanz stellten wir 5 Stufen (0 bis 5) auf, wobei der stärkste Grad mit "5" bezeichnet wurde. Als positiv gewertet wurden hierbei lediglich die in den Rin-

denzellen angetroffenen fuchsinophilen Substanzen. Dies muß besonders betont werden, da man häufig V i n e s - positive Elemente ausserhalb der Rindenzellen, insbesondere in den Gefäßräumen (Erythrozyten etc.) antrifft. Besonders bevorzugt waren bezüglich der Lokalisation die äußere und mittlere Fasciculata, im Gegensatz zu Befunden in der menschlichen Nebennierenrinde, bei der die Fuchsinophilie der Reticularis im Vordergrund steht.

### e) Die Einteilung in Belastungsstufen

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse zu den jeweiligen Belastungsarten wurde die Höhe der Belastung an Hand einer Belastungstabelle (s. S. 10) abgelesen. Die Einstufung erfolgte nach Summation der Einzelbelastungen in ein willkürlich aufgestelltes Schema von 10 Belastungs-Stärkegraden.

So stellt im einzelnen die Grundbelastung die Entnahme des Tieres aus dem Stall dar. Sekundäre und tertiäre Belastungsfaktoren sind gegeben durch Tötung, mehrere Schüsse, Operation, Wasserschock etc. Eine solche Einteilung erwies sich als zweckmäßig, um Vergleichsbetrachtungen zwischen Belastung und Ergebnis der einzelnen Versuchsreihen anstellen zu können.

## III. E r g e b n i s s e

### 1. Normale Histologie und Histochemie der Ratten-NN

a) Die Gewinnung des Normaltieres:

Bei den für wissenschaftliche Zwecke durchgeführten Versuchen - wofür sie auch immer sein mögen - vergleicht man im allgemeinen die Versuchstiere mit Kontrolltieren. Der Unterschied zwischen beiden liegt lediglich darin, daß die Versuchstiere veränderten Umweltsbedingungen ausgesetzt werden, die Kontrolltiere dagegen nicht. Da man für die vergleichende Betrachtung von Untersuchungsergebnissen nur eine Ausgangsbasis benötigt, die zum Vergleich gezogen werden kann, bleibt der Relationswert all dieser Untersuchungen selbstverständlich ungemindert. Jedoch handelt es sich bei diesen Vergleichstieren nicht um "Normale" im Sinne der Definition des Wortes, denn auch diese Tiere werden letzten Endes einer veränderten Umwelt ausgesetzt in dem Moment, in welchem sie getötet werden. Die Tötungsaktion ist aber kein dem Normalphysiologischen angehöriger Vorgang und bedeutet gerade für den Hormonhaushalt eine akute Veränderung

## B e l a s t u n g s - T a b e l l e

| Versuchsreihe | Grundbelastung | Sekundärer Belastungsfaktor | Tertiärer Belastungsfaktor | Belastungswert |
|---|---|---|---|---|
| Normaltiere (Äther oder CO) | Entnahme | Tötung | - | 3 |
| Normaltiere (Schußtiere) | - | Schuß | - | 1 oder 2 |
| Operationstiere (op.entfernte NN) | Entnahme | Operation | - | 3 |
| Operationstiere (Nach 1 Stunde) | Entnahme | Operation | Ersatz der fehlenden NN.Postop.Zustand.Tötung | 5 |
| Schußtiere (Mehr als zwei Schuß längere Tötungszeit) | - | Schüsse | Tötungszeit | 2 oder mehr (bis 10) |
| Schwimmtiere | Entnahme | Wasserschock | Schwimmen Tötung | 5 (Ertränkung.bis 10) |
| Psychischer Stress mit sofortiger Tötung | - | Psychischer Stress | - | 2 |
| Psychischer Stress mit verlängerter Tötungszeit | | Psychischer Stress | Körperlicher Stress | 2 oder mehr (bis 10) |

der Beanspruchung, eine Belastung, oder mit S e l y e s Worten ausgedrückt: einen Stress. Dies erscheint besonders wichtig für Untersuchungen, die Aufklärung über die Veränderungen beim akuten Stress geben sollen. Hierbei würde es interessieren, eine "wirklich normale" Nebenniere zu kennen und ihre histochemischen Gegebenheiten zum Vergleich mit den akut belasteten studieren zu können, denn cytomorphologische und besonders strukturelle Veränderungen - etwa im Sinne T o n u t t i s - können infolge zu kurzer Zeitspanne bei akutem Stress nicht auftreten.

Es scheint aus dieser Erwägung heraus nicht gleichgültig zu sein, welche Tötungsart man - gerade bei Untersuchungen an innersekretorischen Organen - wählt, und welches Nebennierenbild man für "normal" anspricht. Diese Vorsicht wird begründet durch die Untersuchungen von H e n i , G r u n e r und M a s t , die mit der NAHD bereits bei kleineren Manipulationen, Scheinoperationen, Kurznarkosen etc. deutliche Veränderungen des Reaktionsausfalles feststellen konnten, während die anderen Reaktionen keine wesentlichen Abweichungen zeigten. Verff. fanden bei "Normaltieren" eine Anfärbung der gesamten Rinde. Offenbar verwandten sie ebenfalls eine weitgehende belastungsfreie Tötungsart zur Gewinnung von Normaltieren, denn auch unsere durch Schuß gewonnenen Normaltiere zeigten eine vollständige Rindenanfärbung.

Wertet man die Tötung eines belasteten Tieres als einen zweiten Stress, so tritt der von verschiedenen Autoren beobachtete Fall eines "sekundären Stress" ein (M u r r a y und M o r g a n , S e l y e ) Der zweite Stress soll dabei eine Erhöhung der Widerstandskraft hervorrufen, die gegen den ersten Stress gerichtet ist. Da der Widerstand gegen den zweiten Stress dabei oft sehr deutlich herabgesetzt ist, spricht man in solchen Fällen auch von einer "gekreuzten Resistenz". M u r r a y und M o r g a n konnten diese Feststellungen machen, als ein Vitamin-C-Mangel belastetes Meerschweinchen eine Resistenzzunahme bei nun folgender Anoxie aufwies. R a t s i m a - m a n g a u.a. benutzten als ersten Stress Schwimmbelastungen und als zweiten Temperaturveränderungen. Dies spielt natürlich für den Vergleichswert einer Tierreihe keine Rolle, jedoch ist aber ein Hinweis, daß die Tötungsart (bei Belasteten der "sekundäre Stress") für das histochemische Endbild wohl nicht ganz gleichgültig ist. Selbst dann nicht, wenn die Aktion des Primärstress - wie im Falle der Tötung als Sekundärstress - bereits beendet ist. Für dieses Phänomen der gekreuzten Resistenz ist offenbar eine gewisse, bereits vorhandene Adaption*durch den ersten Stress erreicht (B a c h m a n n)

* Bei S e l y e Adaptation, aber auch Adaption.

und auch notwendig, denn bei einem Todeseintritt als Folge eines schweren Stress (akute Diaprasie mit totaler Erschöpfung) soll dieser Mechanismus nicht eintreten. Für die bisher unter gleichen Bedingungen für jede Tierreihe durchgeführten Versuche spielen diese Besonderheiten eine geringe Rolle, jedoch erscheint es für die Beurteilung von empfindlichen Reaktionen (z. B. die NAHD-Reaktion) von Wichtigkeit zu sein, wie eine normale Nebennierenrinde histochemisch beschaffen ist, z. B. die einer sich in dösender Mittagsruhe befindlichen Ratte.

Beim Menschen ist dieses Problem zweifellos noch viel größer, weil wir selbstverständlich keinerlei Möglichkeit haben, den Tod nach dem Grade seiner Belastung zu dosieren und eine Kontrolle des dabei auftretenden Stresses nur gewissermaßen retrospektiv möglich ist. Auch ist es pathologisch-anatomisch nicht möglich, alle ante finem mehr oder weniger vorhanden gewesenen Belastungen zu erfassen und dadurch einen Rückschluß auf die Gesamtbelastung zu erkennen. Spielen doch die mannigfaltigsten Faktoren hierbei eine große Rolle: Ein Soldat, der durch Herz- oder Hirnschuß in kürzester Zeit zu Tode kommt, befindet sich schon vorher mehr oder weniger lang in den verschiedensten Konfliktsituationen, die seinen Hormonspiegel beeinflussen, und ein im Straßenverkehr umkommender Mensch zeigt meist derartig schwere körperliche Verletzungen, daß man auch hier nicht mehr von "normalen Nebennieren" sprechen kann. Doch gerade im Straßenverkehr und auch bei anderen kurz dauernden, tödlich ausgehenden Traumen kann es Fälle geben, bei denen Menschen aus völlig ausgeglichenem Hormonspiegel ("normal") heraus bei einer geringsten Belastung in kürzester Zeit zu Tode kommen. Doch besteht hier keinerlei Kontrollmöglichkeit.

Im Tierversuch liegt es schon eher in unserer Hand, eine Dosierung der zum Tode führenden Belastung durchzuführen, doch ist das auch hier ein großes Problem.

Zunächst ist für die Bestimmung eines annähernd normalen histochemischen Status wichtig, zu welcher Tageszeit die Tiere getötet werden. Bekanntlich liegt der Höhepunkt hormoneller Aktivität bei Nachttieren - dazu gehören auch die weitgehend domestizierten weissen Ratten - in den Abendstunden. Abgesehen von diesen Tagesschwankungen bestehen eventuell auch noch jahreszeitliche. K r a c h t - S p a e t h e konnten an den Größenverhältnissen der Nebennieren von Wildkaninchen deutliche jahreszeitliche (offenbar Klima-bedingte) Unterschiede feststellen. Hierbei sollen von Januar bis April die NN deutlich größer sein als im Herbst. Untersuchungen außerhalb

der üblichen Jagdzeiten liegen leider nicht vor. Weiterhin ist es notwendig, einen gewissen psychisch ausgelösten, emotionellen Faktor miteinzurechnen, der - wie ja auch beim Menschen - für jedes Tier verschieden ist. So kann man beim Betreten des Tierstalles beobachten, daß manche Tiere in neugieriger Weise an das Käfiggitter springen und an einer hingehaltenen Pincette knabbern, andere scheu und mit deutlich beschleunigter Pulsfrequenz in den hintersten Winkeln des Käfigs sitzen und wieder andere aufgeregt von einer Käfigecke in die andere springen und durch diese einander ablösenden Fluchtaktionen ihrer psychischen Erregung Rechnung tragen. Besonders empfindlich sind die Ratten - wie alle Nager - gegenüber Luftzug jedweder Art, worauf sie mit sofortigen Rückzugsbewegungen reagieren. Auch hierbei sind aber in der Stärke der Fluchtaktionen deutliche Unterschiede der einzelnen Tiere zu erkennen.

aa. Die bisher übliche Gewinnung von Normaltieren.

Betrachtet man nun den Weg, der uns zur Gewinnung von "normalen" Rattennebennieren führt, so muß man sagen, daß er voller versteckter Belastungen und Stressituationen steckt. Der Vorgang ist in kurzen Worten etwa folgender: Annäherung an den Stall, Öffnen der Türe und Herausnehmen des vorher bereits ausgewählten Tieres mit einer genügend langen Greifzange oder der Hand. Anschließend sofort in ein luftdicht abschließbares Glas bringen und mit einem möglichst rasch wirkenden gasförmigen Pharmakon töten. Als sehr wirksam erscheint Äther oder Leuchtgas. Mit Injektionsspritze applizierte Mittel haben wegen der wesentlich größeren direkten Körpermanipulationen keinen Vorteil.

Bei dieser Art der Tötung, selbst wenn sie komplikationslos verläuft, kann man in den meisten Fällen allein bis zum Stadium der Narkose so mannigfache Fluchtreaktionen (Schreie, Beiß- und Kratzversuche) beobachten, daß es sehr unwahrscheinlich ist, damit das "normale" histochemische Bild zu erfassen. Weiter bedeutet das narkotische Stadium bis zum Eintritt des Todes eine Belastung, wie H e n i , G r u n e r und M a s t mit der NAHD-Reaktion zeigen konnten. Der Tod durch Äther oder Gas stellt eben - wie die von den Verff. durchgeführten Kurznarkosen - einen Stress dar.

Wird das Tier - nach einer anderen Tötungsart - sofort nach Herausnahme aus dem Stall erschlagen, so ist hierbei der körperliche Reiz so stark, abgesehen von den sich noch aus der Umwelt einstellenden und summierenden Teilbelastungen, daß auch hier vermutlich nicht das eigentlich "Normale" der Nebennierenrinde vorliegt. Einige orientie-

rende Tötungsversuche dieser Art zeigten uns histochemisch deutliche Stressreaktionen.

bb. Eigene Methode zur Gewinnung von Normaltieren.

Ausgehend von diesen Überlegungen kann man sagen, daß es darauf ankommt, die Tiere zu Tode zu bringen, ohne daß sie vorher davon optisch oder akustisch eine Wahrnehmung haben. Die Zeit vom Beginn der Tötungsaktion bis zum Eintritt des Todes muß möglichst kurz gehalten werden, was bei den außerordentlich wendigen Tieren ziemliche Schwierigkeiten bedeutet, wenn sie erst einmal eine Wahrnehmung von der ganzen Aktion gemacht haben.

Im Bestreben, dieser Forderung weitgehend gerecht zu werden und eine möglichst physiologische, mittlere Hormonlage zu treffen, wurde folgende Versuchsanordnung getroffen: Zeitlich wurden die Versuche auf den frühen Nachmittag gelegt, also einer Zeit mit mittlerer Hormonlage. Beobachtungen ergaben, daß sich die Tiere zu dieser Zeit durchweg ruhig, dösend verhielten. Das betreffende Tier war vorher schon - mindestens 24 Stunden vor dem Versuch - in einen Einzelstall verbracht worden, um eine genügend lange Zeit zur Eingewöhnung und damit eine gewisse Beruhigung des Hormonspiegels zu gewährleisten. Zur oben angegebenen Zeit wurde das Tier dann - ohne daß es vorher eine Wahrnehmung optischer oder akustischer Art hatte - mit einem Luftgewehrbolzen (Kaliber 4,5) durch Schuß von der Seite in Höhe des Ohres getötet. Ein als gelungen bezeichneter Versuch zeigt dabei folgende Reaktionen: Das Tier fällt nach einem kurzen Sprungversuch in einen Krampf tonisch-klonischer Art, der innerhalb von Sekunden mit dem Tode endet.

Ein zu diesem Zeitpunkt abgegebener Testschuß zeitigt keinerlei Reaktionen mehr. Die Nebennieren werden unmittelbar im Anschluß daran entfernt und in neutrales, ameisensäurefreies Formalin gegeben. Die Sektion des Schußkanals ergibt in solchen Fällen, daß der Bolzen quer in der Stammhirngegend liegt. In Fällen, in denen der Bolzen diese Gegend glatt durchschlug, waren die Reaktionen die gleichen.

Zur Kritik dieser Methode ist zu sagen, daß auch hier noch Fehlerquellen und versteckte Stressmomente vorhanden sind. Doch scheint die Latenzzeit vom Aktionsbeginn bis zum Todeseintritt durch die beschriebene Versuchsanordnung genügend klein gehalten. Ganz besonders wichtig ist die Frage, inwieweit die Durchkreuzung von Hirnsubstanz, die ja hierbei eine unvollständige ist und nicht einer totalen Durchtrennung entspricht, einen Reiz auf die Hypophyse darstellt, und ob die Latenzzeit von unter einer Minute noch ausreicht für eine adreno-

corticotrope Wirkung von Seiten der Hypophyse. Dies erscheint zum mindesten in stärkerem Maße unwahrscheinlich.

Eine der Forderung maximal reduzierter Latenzzeit gerecht werdende Versuchsanordnung wäre durch eine in den Stall eingebaute Guillotine nach Art eines unter starkem Druck stehenden Fallbeiles gegeben. Wenn dann das Tier wie zufällig innerhalb seiner Gewohnheiten in die für die Versuchsanordnung optimale Position käme, müßte nach Auslösen des Mechanismus innerhalb von Sekundenbruchteilen der Kopf vom Rumpfe des Tieres getrennt werden und damit jede zentral bedingte Veränderung in der Nebennierenrinde ausgeschaltet sein. Diese Methode wird späteren Versuchen vorbehalten bleiben.

Wertet man die partielle Durchtrennung des Gehirns als Stress, so besteht dieser Stress in unseren Fällen immer nur für Sekunden. Besonders scheint es aber wichtig zu sein, daß jede Art eines emotionellen Stresses hierbei ausgeschaltet ist.

Selbstverständlich kam es sehr häufig bei diesen Versuchen vor, daß der durch das Gitter abgegebene Schuß sein Ziel verfehlte und das Tier an anderer Stelle traf. Die hierdurch ausgelöste sehr starke Fluchtreaktion machte es sehr schwierig, das Tier noch einmal zu treffen. In manchen Fällen waren bis zu 5 Schuß notwendig. Die so "mißlungenen Versuche" wurden bezüglich ihrer Einordnung als schwerer, akuter Stress gewertet. Das doch recht geringe Material von "gelungenen" Fällen (7 unter einer Minute, davon 3 mit nur einem Schuß) erlaubt natürlich keine endgültigen Schlüsse, doch erscheinen die gefundenen Ergebnisse recht aufschlußreich.

Mit dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, inwieweit sich bei den histochemischen Befunden Abweichungen von den in üblicher Art und Weise gewonnenen Normaltieren ergeben.

Befunde von Schußtieren unter einer Minute Tötungszeit

Die Gesamtbelastung besteht hier lediglich aus der eines (oder 2) Schusses, Belastungswert 1 (bzw. 2). Beide Untergruppen sind gekennzeichnet durch einen Zeitfaktor von bis zu einer Minute. Sowohl die Sudanfärbbarkeit, als auch die doppeltbrechenden Substanzen wiesen keinerlei Entspeicherung auf. Die NNR war gleichmäßig, nach der Zona reticularis zu abnehmend, positiv.

Bei den 3 Fällen mit einem Schuß und einer Belastungszeit von unter einer Minute zeigt sich sehr eindrucksvoll, daß weder eine Entspeicherung mit der NAHD-Reaktion, noch auch nur geringste Ansätze einer Fuchsinophilie nachzuweisen sind.

Bei den 4 Tieren der zweiten Untergruppe (2 Schuß innerhalb einer Minute) ist die Entspeicherung mit der NAHD-Reaktion schon deutlich, die V i n e s - Reaktion aber weiterhin völlig negativ (s.Fig.1 S.17).

Befunde von "Normaltieren", die durch Äther oder CO getötet wurden

Die Gesamtbelastung setzt sich hier zusammen aus der Entnahme (Grundbelastung) und der Tötungsaktion. Setzt man die Entnahme als primären Stress mit dem Stärkegrad "2" an, so kommt man insgesamt auf eine Belastung vom Werte "3".

Sudanfärbung und Doppelbrechung verrieten auch hier keinerlei Belastung. Jedoch war in allen Fällen eine, wenn auch nicht gleichmäßige, Entspeicherung der Carbonylgruppen bei der NAHD-Reaktion nachzuweisen. Während Zona glomerulosa und fasciculata noch deutlich anfärbbar waren, zeigten die innere Fasciculata und die Reticularis keine Reaktion.

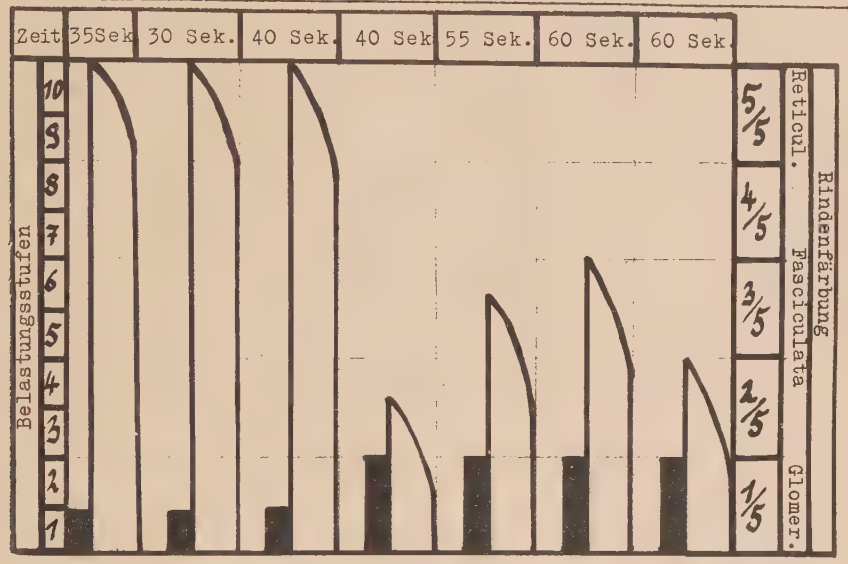
In allen Fällen war nun eine positive V i n e s - Reaktion vorhanden, vor allem im Bereich der äußeren Fasciculata. In typischer Weise trat das positive Material entweder in einzelnen Zellen als verschieden große Granula auf oder auch in Zellgruppen. Die Stärke der Reaktion erreicht hier nur mittlere Grade, der Durchschnitt liegt beim Werte 1,5-2 (s. Fig. 2 S. 17).

b) Eigene Befunde im Vergleich zur bisherigen Literatur.

Dem Vergleich dieser Befunde mit den bisher in der Literatur geschilderten "Normalbildern" sollen einige allgemeine Bemerkungen über die Histologie der NNR der Ratte vorangestellt werden. Bei den erwachsenen Ratten sind die Verhältnisse ganz ähnlich denen der menschlichen NNR. Die übliche dreigeteilte Zonierung ist auch hier vorhanden. Man unterscheidet eine Zona glomerulosa, Zona fasciculata und Zona reticularis. Häufig findet man versprengte Rindenanteile - wie beim Menschen - im Mark und umgekehrt (S t ö h r). Die Zonierung der Rinde ist am besten zu erkennen bei Betrachtung mit der Lupe. Die subglomeruläre sudanophobe Zone einerseits, der starke Fettgehalt der Zona fasciculata andererseits und der wiederum weniger starke Gehalt an Lipoidstoffen der Zona reticularis läßt die einzelnen Schichten gut erkennen. Nach B o u r n e sind diese Verhältnisse bei allen Rattenstämmen - auch bei Wanderratten - im wesentlichen die gleichen. Über die Verhältnisse der Zellneubildung, Zelldegeneration, besonders über Zellgrössenänderungen und wechselnde Zonenbreiten in Abhängigkeit der Funktion und Beanspruchung der NNR hat T o n u t t i in letzter Zeit umfangreiche Arbeiten veröffentlicht. Die Transformationslehre erlaubt nach T o n u t t i eindeutig Rückschlüsse auf den Funktionszustand der NNR.

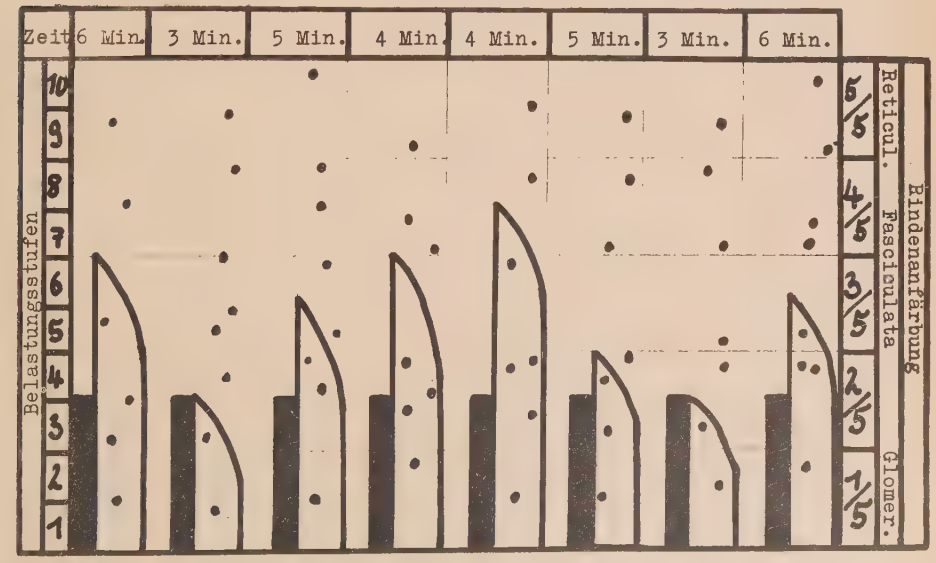
F i g u r 1

7 N o r m a l t i e r e (getötet durch Schuß innerhalb 1 Minute)




F i g u r 2

8 "N o r m a l t i e r e" (durch Äther oder Gas getötet)




Legende zum Verständnis der graphischen Darstellungen

Die einzelnen Figuren stellen jeweils ein Schema der Nebennierenrinde dar.

Dabei entsprechen:

a. der Zona glomerulosa die mit 1/5 bezeichnete Zone
b. der Zona fasciculata die mit 2/5, 3/5 und 4/5 bezeichneten Zonen
c. der Zona reticularis die mit 5/5 bezeichnete Zone.

Die Verjüngung der Anfärbbarkeits-Säulen wird der nach den zentralen Partien zu allmählich schwächer werdenden Anfärbung gerecht.

Anstelle einer laufenden Nummer sind die einzelnen Fälle durch den jeweiligen Zeitfaktor gekennzeichnet.

Bei jedem Fall steht die Säule der Belastung unmittelbar vor der Darstellung der Anfärbbarkeit.

Zeichenerklärung

Anfärbbarkeit mit der NAHD-Reaktion

Belastung in 1o Stärkegraden(s. Tab. S.1o)

Intrazelluläre, fuchsinophile Substanz
( V i n e s )

Histochemische Vergleiche: Die Verteilung der sudanpositiven Stoffe in der NNR der Ratte nimmt von den äußeren Teilen nach innen zu ab (K o l m e r). Mit dieser im Jahre 1918 getroffenen Feststellung befinden sich die meisten anderen und auch unsere beiden Reihen in Einklang. Gelegentlich sahen wir eine Aufteilung der Zona fasciculata in eine "äußere" und eine "innere" Zone, wie sie B a c h - m a n n beschreibt, wobei die äußere Unterzone stärker lipoidhaltig ist als die innere. Fleckförmige Verteilung von Lipoidstoffen (W a l r a f f) konnten wir bei unseren akuten Fällen nicht nachweisen. W a l r a f f hat sie bei angeblich normalen, allerdings menschlichen NNR gesehen, während B a c h m a n n dieses Phänomen als Kunstprodukt wertet. Die sudanophobe Zone konnten wir in einem Drittel der Fälle nachweisen.

Die Verteilung der doppeltbrechenden Substanzen untersuchten W e a v e r und N e l s o n an der Ratten-NN. Ihre Ergebnisse entsprechen der Verteilung der Sudanpositivität und stimmen mit unseren Befunden überein. Im allgemeinen fanden wir die Doppelbrechung etwas schwächer als die Sudanophilie. W e a v e r und N e l - s o n nehmen nach der Stärke der vorhandenen Doppelbrechung eine 4-Zoneneinteilung vor, wobei der stärkste Grad der Doppelbrechung im Bereich der äußeren Fasciculata liegt. Die sudanophobe Zone erweist sich als optisch inaktiv. Y o f f e y und B a x t e r untersuchten die Doppelbrechung am frischen unfixierten Material (Gefrierschnitte). Sie stellten fest, daß bei unfixiertem Material wesentlich weniger Kristalle nachweisbar sind und daß diese Kristalle sich erst nach Liegenlassen der Schnitte bei Zimmertemperatur nach Tagen richtig bilden. Verff. sind der Meinung, daß die Entstehung der Kristalle so zu erklären ist, daß optisch zunächst inaktives Material zerfällt und dann Doppelbrechung ergibt, so z. B. Lipoproteine.

Das Bild der Rattennebenniere bei Carbonylreaktion, zu denen die NAHD-Reaktion von A s h b e l und S e l i g m a n gehört, wurde von F e l d m a n n wie folgt charakterisiert: Bei geringer Anfärbung der Glomerulosazellen zeigt sich eine kräftigere Anfärbung der Fasciculata. Die Reaktionsintensität nimmt markwärts ab und zeigt schließlich in der Zona reticularis nur noch ganz schwache Reaktion. Dies deckt sich mit unseren Befunden der ersten Reihe, jedoch nicht mit den in üblicher Weise (Gas) gewonnenen "Normaltieren", hier fanden wir eine deutliche Entspeicherung. Daß die größten sudanophilen Tropfen sich nicht mit Carbonylreagentien anfärben, konnten wir ein-

deutig bestätigen. Feldmann erzielte mit dem Schiff'schen Reagens die gleichen Ergebnisse. Heni, Gruner und Mast kamen zu wichtigen Ergebnissen, als sie mit der NAHD-Reaktion die Verhältnisse der normalen und der belasteten NNR untersuchten. Sie stellten fest, daß bei normalen NNR die gesamte Rinde angefärbt wird, mit Schwerpunkt in der äußeren Fasciculata. Hiermit steht unsere erste Reihe der Normaltiergewinnung in vollem Einklang. Die zweite Feststellung der Verff., nämlich daß bereits kurzdauernde Manipulationen Entspeicherung der NAHD-Substanzen hervorruft, entspricht unserer Reihe durch Gas gewonnener "Normaltiere". Eger machte in seiner Arbeit (über die NN bei der Glykogenbildung in Leber und Fettgewebe) die Beobachtung, daß die Plasmareaktion bei Ratten ziemlich gleichmässig ausfällt. Nach seinen Untersuchungen ist die Glomerulosa sehr dicht mit positiver Substanz beladen, es läßt sich eine deutliche Abgrenzung nach der Fasciculata zu nachweisen mit nur ganz geringer und diffuser Positivität. Die Reticularis ist bei seinen Fällen ganz frei. Frazao fand bei Untersuchungen infantiler Rattennebennieren Glomerulosa und äußere Fasciculata deutlich positiv, während der Rest der Rinde nur eine schwache Anfärbung gab. Bei erwachsenen Ratten fand sich ein ganz ähnlicher Befund, lediglich eine mäßige Verbreiterung der positiven Fasciculataanteile wurde festgestellt.

Bei der Färbung nach Vines ergeben sich sehr wechselnde Befunde. Eger seinerseits kommt zu dem Schluß, daß der verschiedene Ausfall und das geradezu "wahllos" mehr oder weniger Vorhandensein der fuchsinophilen Substanz eher auf technische Besonderheiten und Fehler zurückzuführen ist als auf irgendwelche funktionellen Veränderungen. Gerade die technischen Fehler aber treten nach unserer Meinung bei der Vines - Färbung eigentlich in den Hintergrund, wenn man bedenkt, welche Schwierigkeiten die NAHD-Reaktion unter Umständen machen kann. Unsere Befunde, die bei den beiden Reihen der Normaltiergewinnung erhoben wurden, sagen folgendes aus: Das Normaltier, d. h. das möglichst gering belastete Tier, zeigt in der Nebennierenrinde überhaupt keine fuchsinophile Substanz, während bereits geringe Belastung, z. B. auch die Gastötung, das Auftreten fuchsinophiler Granula in den Nebennierenrindenzellen zur Folge hat. Liebegott bestätigt das Auftreten von Fuchsinophilie bei akuten Belastungen. Auf die Befunde von Zinsser, A. D. und H. H. Zinsser wurde bereits hingewiesen und ebenso auf den Nachweis der Fuchsinophilie der Hiluszellen des Ovars (Dhom). Letztere Untersuchungen, sowie die von Zinsser, A. D. und H. H. Zinsser sind vor allem dazu angetan, die Bedeutung der fuch-

sinophilen Substanz im Hinblick auf den Funktionszustand hormonell wirksamer Organe zu unterstreichen.

2) Der akute Stress und die dabei auftretenden histochemischen Veränderungen in der Rattennebennierenrinde

Gegen Ende des vergangenen Jahrhunderts stellten französische Forscher Veränderungen an den Nebennierenrinden bei Infektionen aller Art fest (V i n c e n t u. a.). Die Untersuchungen wurden an menschlichen NN durchgeführt und in umfangreichen Untersuchungen jeder infektiösen Belastung ein spezifisches Nebennierenrindenbild zuerkannt.

Erst durch S e l y e wurde mit der Aufstellung des Begriffes "Stress" und dem dazugehörigen reaktiven Funktionszyklus die viel weitere Bedeutung der damaligen V i n c e n t ' schen Befunde herausgestellt. "Stress", definiert als "Druck" oder "Belastung", als Sammelbegriff für Reize jedweder Art, veranlaßt eine unspezifische Reaktion. Am Reizort kommt es zu einer Stoffwechselstörung. Dieser, von S e l y e als "katabolischer Impuls" bezeichnete Vorgang bedeutet eine Störung in der Gesamtheit der funktionellen Organharmonie. Es erfolgt nunmehr - auf noch nicht ganz geklärten Wegen - eine Registrierung dieser Störung im Hypophysenvorderlappen, vermutlich über das Zwischenhirn. Von der Stärke und Dauer des Reizes ist es nun abhängig, in welchem Maße von der Hypophyse ACTH zur Anregung der NNR-Hormon-Produktion abgegeben wird. Dieser Ausgleichsversuch von Seiten des Organismus wird von S e l y e als Adaptionsversuch bezeichnet. Inwieweit aber diese Reaktion in physiologisch zumutbaren Grenzen verläuft, oder inwieweit etwa Erschöpfung der Nebennierenrinde eintritt, das ist außer von der Reizstärke und -dauer auch noch von anderen Dingen abhängig: Besonders wichtig ist hierbei sicherlich die Tatsache einer hormonellen Ausgangslage, also der Grundsituation des Hormonspiegels, den die NNR zum Zeitpunkt des Auftreffens des Stress aufweist. Ob es sich etwa um Hyperfunktionsorgane, also progressiv transformierte (T o n u t t i) handelt, oder ob eine Unterfunktion im Sinne einer regressiven Transformation vorliegt (T o n u t t i). Die Vorbelastung, die zu letzterem Bilde führt, ist ursächlich sowohl körperlich als auch psychisch möglich. Die teilweise erzielte Mannigfaltigkeit und manche Differenz der erzielten Versuchsergebnisse ist daher nicht nur verständlich, sondern geradezu zu erwarten.

So liegt doch auch allen diesen Untersuchungen, mögen sie nun vom Sektionsmaterial oder aus Tierexperimenten stammen, immer wieder

das Einzelindividuum zugrunde, über dessen - nun speziell gesehen - hormonellen Grundspiegel, Reaktionsaktivität und -bereitschaft wir nur wenig in Erfahrung bringen können. Dies umso mehr in der menschlichen NNR, umso weniger bei bis zu einem gewissen Grade kontrollierbaren Tierversuchen.

Die Veränderungen, die sich bei Belastung der Versuchstiere ergeben, sind in der NNR der Ratte sowohl histochemischeals auch Zell- und Strukturwandlungen. Diese auftretenden Veränderungen wurden in umfangreichen Arbeiten bei den verschiedensten Belastungen untersucht. Aus der Vielzahl der durchgeführten Stressversuche sollen nur Gruppen herausgestellt werden. Will man eine Grobeinteilung des Stressgeschehens vornehmen, so kann man zunächst 2 große Gruppen voneinander unterscheiden, die auch im Rahmen des Adaptionsmechanismus 2 ganz verschiedene Wege gehen:

1. Der akute, kurzdauernde Stress.
2. Der chronische, längerdauernde Stress.

Nur bei letzterer Gruppe kann es natürlich wegen der größeren Zeitspanne zu Veränderungen der Rindenzellen im Sinne T o n u t t i s kommen, zu einer Transformation progressiver oder regressiver Art, während akuter Stress in Abhängigkeit von der Stärke der Belastung Entspeicherung oder auch Speicherung der NNR bewirkt. Die Bezeichnung dieser beiden Vorgänge wurde von B a c h m a n n als Diaprasie (Entspeicherung) und Enchosis (Speicherung) gegeben.

Stressversuche an Tieren (insbesondere an Ratten und Meerschweinchen) wurden durchgeführt als: Ernährungsänderungen, Hunger- und Durstversuche, Vitaminmangel, Muskelbeanspruchung, Wärme- und Kältestress, Infektionskrankheiten, Hormongaben, Anoxie, Röntgenbestrahlung, Lärmstress, Traumen, Schmerz und viele andere Arten. Auch psychische Stressversuche wurden durchgeführt. Meistens wurden dabei chronische Belastungen verwendet und die hierüber vorhandene Literatur ist kaum noch zu übersehen. Alle Arbeiten dieser Art jedoch passen in das S e l y e ' sche Adaptionsschema hinein und stellen damit wichtige Bausteine für das Verständnis der Lehre vom Stress dar.

Auch die histochemischen Veränderungen unterliegen der Stärke und Dauer des Stresses. Die Reaktion ist im wesentlichen immer wieder die gleiche im Rahmen des Adaptionszyklus verlaufende - progressive und regressive Transformation für chronische, Enchosis und Diaprasie für akute Belastungen. Selbstverständlich kann durch Stresssteigerung oder sekundären Stress auch eine progressive Transformation zur totalen Diaprasie gelangen. Wichtig sind für unsere Versuchsreihen

die Verhältnisse bei der NAHD-Reaktion nach A s h b e l und S e l i g m a n und bei der Färbung der fuchsinophilen Substanz nach V i n e s .

Bei der Besprechung des Normaltieres wurde schon kurz auf beide Färbungen bei Belastungen eingegangen. Hier soll nun nochmals das wichtigste gesagt werden: Die Ketosteroidreaktionen unterliegen nach D e a n , S h a w und R o g e r s ebenfalls dem S e l y e 'schen Adaptionszyklus; besonders eindrucksvoll nachgewiesen wurde das von H e n i , G r u n e r und M a s t , die aus ihren Ergebnissen zu dem Schluß kommen, daß die Empfindlichkeit der NAHD-Reaktion wesentlich größer ist als die der anderen Reaktionen. Während Sudan- und Polarisationsschnitt noch keine Veränderungen zeigen, ist bei der NAHD-Reaktion bereits eine deutliche Entspeicherung nachzuweisen.

Bezüglich der Färbung der fuchsinophilen Substanz nach V i n e s schreibt L i e b e g o t t , daß bei akuten Belastungen als Ausdruck der gesteigerten Aktivität innerhalb der fettgespeicherten Rindenzellen verschieden große "hyaline Tropfen" sich finden, die auch bei Masson- oder Goldnerfärbung deutlich zu erkennen sind. Weiterhin geht aus L i e b e g o t t s Untersuchungen an der menschlichen NNR hervor, daß bei deutlich erhöhtem Herzgewicht (genuine oder renale Hypertonie) das Gewicht der NN deutlich ebenfalls ansteigt. Daneben finden sich reichlich fuchsinophile "hyaline Tropfen" in den Rindenzellen. Parallel dazu sind auch die anderen Reaktionen deutlich positiver. Bei den untersuchten Fällen handelte es sich um kompensierte Herzfehler. A d a m s und B a x t e r führen keine Trennung zwischen kompensierten und dekompensierten Herzfehlern durch und kamen dadurch zu anderen Ergebnissen. R a t h e r und D e a n konnten die L i e b e g o t t ' schen Ergebnisse bestätigen.

## 3. Eigene Untersuchungsreihen

### a) Nicht gelungene Schußversuche, die dadurch zu schweren Belastungen wurden.

Bei dieser Reihe von 13 Tieren ist die Belastung eine ganz verschiedene und richtet sich ganz nach dem Zeitfaktor und den benötigten Schüssen. So muß beim ersten Tier die größtmögliche Belastung angesetzt werden, da dieses Tier erst nach 6 Schuß und 4 Minuten Tötungszeit ad exitum kam.

Die Ergebnisse mit der NAHD-Reaktion sind jedoch trotz der ganz verschiedenen Belastungen recht einheitlich im Sinne einer Entspeicherung der inneren Rindenanteile. Hier tritt nun auch verschiedent-

lich eine Entspeicherung der äußeren Rindenanteile (Zona glomerulosa und fasciculata) auf. In diesem Bereich konnten vielfach größere Vakuolen nachgewiesen werden, wobei sich der gleiche Bezirk im Sudanschnitt als stark positiv erweist.

Ein Fall (nicht in die graphische Auswertung aufgenommen) stellt eine Besonderheit insofern dar, als bei diesem Tier ein fast kastaniengroßes (histologisch gesichertes) Sarkom in abdomine bei der Sektion gefunden wurde und dadurch natürlich bereits eine chronische Belastung des Tieres vorlag. Das Tier machte physisch auch einen kranken Eindruck. Es gelang den Exitus mit einem Schuß und innerhalb von Sekunden herbeizuführen. Histochemisch zeigte sich eine recht breite Rindenanfärbung mit der NAHD-Reaktion von fast 3/5. Trotzdem muß wohl eine bereits in Gang befindliche adaptive Reaktion vermutet werden, ausgelöst durch den chronischen Tumor-Stress, zu dem u. a. auch eine wesentliche Raumbeengung in abdomine gerechnet werden muß.

Die Färbung der fuchsinophilen Substanz nach V i n e s war hier in allen Fällen deutlich positiv (Wert 3-3,5). Neben Zellgruppen fanden sich Einzelzellen mit V i n e s - Substanz. Die Hauptlokalisation war hier die äußere Fasciculata (Fig. 3 S. 24).

b) Akuter Schwimmversuch.

Schwimmversuche wurden als Ermüdungsteste von G a a r e n s t r o o m , W a t e r m a n n und L a q u e u r (1937) durchgeführt. Diese Versuche liegen allerdings im Rahmen eines chronischen Stresses. Unsere akuten Schwimmversuche sollten klären, ob bereits bei kurzfristigem Schwimmen - wir wählten die Zeit von einer Stunde - histochemische Abweichungen in der NNR auftreten würden. Die Versuchsanordnung war folgende: Jeweils ein Tier wurde direkt aus dem Stall in das Wasserbecken verbracht, in welchem es durch entsprechend hohen Wasserstand und glatte Wände gezwungen war, dauernd Schwimmbewegungen zu machen. Die Temperatur hielten wir bei 37°. Nach Ablauf von einer Stunde kamen die Tiere in einen luftdicht abschließbaren Glasbehälter und wurden durch Gas getötet. Darauf folgte die sofortige Entfernung der Nebennieren. Bei dieser Anordnung ist außer der auftretenden Muskelermüdungsbelastung nun noch der Stress der Tötungsart einzurechnen. Praktisch bedeutet das ein Hinzurechnen des bei den mit Gas (in üblicher Weise) getöteten Normaltieren veranschlagten Stressfaktors. Nachdem nun hier die Ermüdung keineswegs so total war, daß man von einem Versuch mit daraus resultierendem Tod sprechen kann, muß dabei an das Phänomen des zweiten Stress, der gekreuzten Resistenz, gedacht werden. Die Bedeutung würde dabei in der erhöhten Widerstandskraft gegenüber dem ersten, und

## F i g u r 3

13 S c h u s s t i e r e

(mit mehr als 2 Schuß und längerer Tötungszeit als 1 Minute)

in der verminderten Widerstandskraft gegenüber dem zweiten Stress liegen. Tatsächlich zeigte sich, daß die Tiere trotz einer gewissen Ermüdung und sichtbarem Ruhebedürfnis mit dem Einströmen des Gases ganz erhebliche Muskelanstrengungen machten und wesentlich rascher zu Tode kamen als Tiere, die ohne Primärstress nur mit Gas getötet wurden. Diese verhielten sich (im Gegensatz zu den Schwimmtieren) im Gasbehälter zunächst wesentlich ruhiger und die Tötungszeit lag deutlich höher.

Ergebnisse dieser Reihe: Die Belastung setzt sich zusammen aus der Entnahme, dem Wasserschock, der körperlichen Schwimmanstrenung und der Tötung (Belastungswert 5). Die Ergebnisse sind hier jedoch keineswegs gleichförmig. Wir erwarteten nach der doch recht hohen Belastung eine deutliche Entspeicherung, jedoch ist diese ganz verschieden. Besonders zeigt sich das mit der NAHD-Reaktion: Einmal weist die innere Fasciculata geringere Anfärbung auf, während äußere Rindenanteile und Reticularis stärker positiv sind. Bei anderen Fällen findet man eine Diaprasie im Bereich der Glomerulosa, äußeren Fasciculata und Reticularis, während die innere Fasciculata deutlicher angefärbt ist.

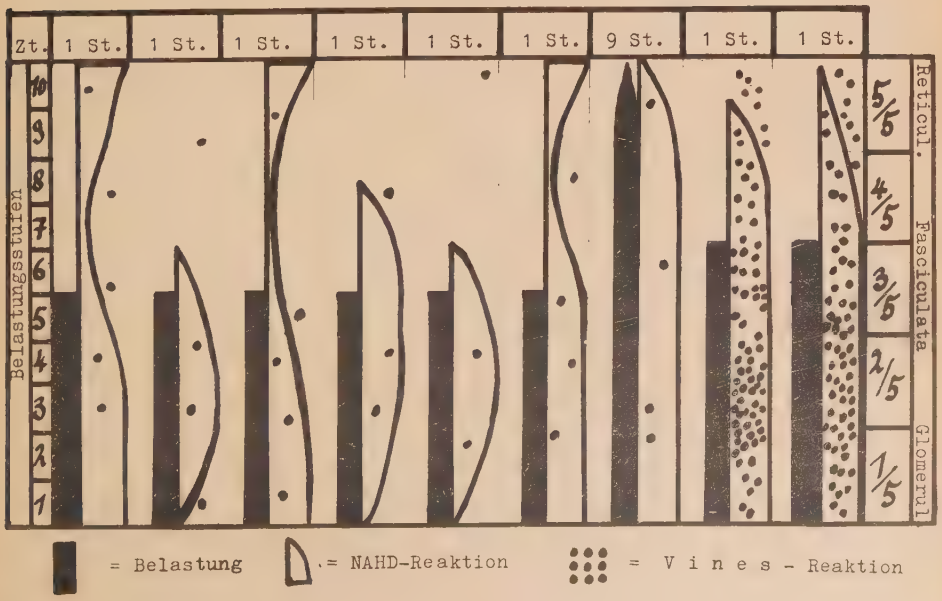
Die V i n e s - Färbung ist zwar auch hier immer positiv (Wert 1), aber keinesfalls so stark, wie z. B. bei den mißlungenen Schußtieren. Bei einem zum Vergleich durchgeführten "chronischen" Schwimmversuch wurde das Tier 9 Stunden im Wasser gelassen. Hierbei zeigte sich, daß die NAHD-Reaktion bereits eine gewisse Adaption aufweist, d. h. wir finden keine großen Unterschiede zu Tieren, die nur eine Stunde geschwommen sind. Die V i n e s - Reaktion war dabei auch nur schwach positiv, im Werte 1. Die Erklärung für diese etwas uncharakteristischen Ergebnisse liegt offenbar darin, daß die Belastung hier weitgehend der Adaptionsfähigkeit des einzelnen Tieres überlassen blieb. Es kam ja hier kein eigentlicher Zwang - wie etwa in einer Lauftrommel - zur Anwendung. Beobachtungen während der Versuche ergaben nämlich, daß sich die Tiere zunächst sehr intensiv im Wasser bewegten, im Laufe fortschreitender Zeit jedoch die Bewegungen rationeller und zweckmäßiger durchgeführt wurden. Schließlich hält sich das Tier unter äußerster Kräfteersparnis nur mit geringsten Muskelanstrengungen über Wasser. Offenbar ist den Tieren hier eine Rationalisierung der geforderten Muskelanstrengung gegeben. Hier sei ein anderes Beispiel ähnlicher Art angeführt: E l l i o t und T u c k e t t berichten von einem Hund, der 30 Meilen gerannt war, und eine deutliche Zunahme der Lipoidsubstanzen in der NNR aufwies. Daß es hier nicht zu vollständigen Diaprasie kam, liegt wohl darin begründet, daß das Tier nicht im Rahmen eines Versuches zu dieser Leistung gezwungen wurde, sondern die Beanspruchung nach "eigenem Ermessen" kompensieren konnte und somit auf-

grund der körperlichen Adaptionsfähigkeit eine adrenocorticale Reaktion entstand im Sinne einer Enchosis. Anders lauten die Befunde, die in der Lauftrommel gewonnen sind, so z. B. von d e J o n g h und R o s e n t h a l , die bei Ratten nach aufgezwungener Muskelarbeit eine deutliche Verminderung des Cholesteringehaltes feststellten. Zu gleichen Ergebnissen kamen auch bei Meerschweinchen K n o u f f , B r o w n und S c h n e i d e r .

In zwei weiteren Vergleichsversuchen wurden die Tiere nach einstündigem Schwimmen dadurch ertränkt, daß eine Glasplatte auf das Wasserbecken gelegt und durch einen Schlauch der Wasserspiegel möglichst rasch bis zur Platte erhöht wurde. Analysiert man hier das kombinierte Stressgeschehen, so kann man sagen: Es hat sich auf einen adaptiv kompensierbaren Muskelanstrengungsstress eine schwere akute Belastung mit tödlichem Ausgang aufgepfropft. Über dies hinaus muß man hier wohl auch einen kurzen, aber intensiven psychischen Stress veranschlagen, ausgelöst durch Aspiration, Dyspnoe und schließliche Apnoe. Die histochemischen Ergebnisse dieser beiden Fälle zeigen bei der NAHD-Reaktion eine breite Rindenanfärbung von 4-5/5. Die V i n e s - Färbung ist hier außerordentlich stark positiv (Wert 4-4,5), dies im scharfen Gegensatz zu den anderen Schwimmversuchen. Sudanschnitte und Polarisation zeitigten keine besondere Befunde. (Fig. 4)

F i g u r 4

9 S c h w i m m t i e r e



Die von H o r t angegebenen Muskelermüdungsversuche sind als absolut chronisch zu bezeichnen. Verf. ließ die Ratten 2 mal täglich in der Lauftrommel bis zur Ermüdung laufen und trainierte sie somit. Die erzielten Leistungen waren verschieden, z. B. lief eine Ratte in 10 Tagen insgesamt 5 100 m. Festgestellt wurde bei diesen Versuchen in Übereinstimmung mit dem S e l y e 'schen Adaptionszyklus eine Hypertrophie der NNR. Die Adaption ist hierbei durch die regelmäßigen Ruhepausen besonders gewährleistet.

Muskelermüdungsversuche, bei denen NAHD-Reaktionen oder V i n e s - Reaktionen durchgeführt wurde, sind in der Literatur bisher nicht angegeben.

Die Schwimmversuche zeigten uns - offenbar in Folge noch vorhandener Adaptionsfähigkeit der Tiere - eine uncharakteristische, ganz verschieden starke Entspeicherung der NAHD-Reaktion und eine gering positive V i n e s - Färbung. Stark positive V i n e s - Reaktion stellten wir bei 2 Versuchen mit sekundärem, schweren akuten Stress fest.

c) Die operative Entfernung einer Nebenniere:

Nach Entfernung einer Nebenniere kommt es innerhalb einiger Zeit zu kompensatorischer Hypertrophie, bzw. Hyperplasie der anderen NN (S t i l l i n g u. a.). E g e r , G o t t e s l e b e n und T i e t j e n untersuchten das Verhalten der alkalischen und saueren Phosphatase bei einseitig adrenektomierten*) Ratten und stellten daneben ebenfalls eine Hypertrophie der NN fest.

Versuchsanordnungen, die durch Ausschalten einer NN eine kompensatorische Vergrößerung der verbliebenen NN hervorbringen sollen, beanspruchen längere Zeit als die von uns gewählte Methode. Die hier gewählte Zeit von einer Stunde diente der Feststellung, ob in dieser Zeit bereits histochemische Veränderungen auftreten,und inwieweit das Fehlen einer NN bereits von der Rest-NN kompensiert werden kann.
Gesamtbelastung: Der erste Stress ist durch die Entnahme aus dem Stall gegeben. Es folgt die Narkosebelastung, die Operation, und schließlich geht das Stressgeschehen mit der Entfernung einer NN in den gewünschten Hauptfaktor über. Es ist also auch hier nicht so, daß lediglich das Fehlen einer NN, sondern mehrere Grund- und Nebenbelastungen eine Rolle spielen.

Die Versuchsanordnung war folgende: Die Tiere wurden aus dem Stall

*) In der neueren Literatur "Adrenalektomie", doch erscheint Adrenektomie sprachlich richtiger.

in ein Gefäß verbracht und darinnen mit Äther die Narkose eingeleitet. Im Toleranzstadium schnallten wir die jeweilige Ratte auf den Operationstisch, und nach Rasieren bzw. Abschneiden der Haare wurde die linke NN entfernt: Anlegen eines paramedianen Schnittes, Luxieren der Darmschlingen, Ligatur der Nebennierengefäße und schließlich Entfernung der NN. Nach Ordnen der Bauchorgane wurde die äußere Naht durch Klammern vorgenommen. Sofort kamen die Tiere in einen mit Holzwolle ausgelegten Stall und erlangten in den meisten Fällen das Bewußtsein sehr rasch wieder. Einige fraßen nach der Operation bereits innerhalb einer halben Stunde wieder. Nach Ablauf von einer Stunde wurde durch reichliche und rasche Gabe von Äther das Tier zu Tode gebracht und die zweite NN entnommen. Die Dauer der Operation betrug nie länger als 10 Minuten.

Für die nach der Operation verbliebene NN ist nun eine wesentlich größere Belastung zu veranschlagen:

1. Die gesamte für die erste NN wirkende Belastungssumme, die sich ja auch auf die zweite NN auswirkt,
2. Hauptbelastung durch Übernahme der Funktion der entfernten NN nach Operation.
3. Tötungsbelastung.

Bei diesem Versuch ist also ein deutlicher Abstand zwischen der Belastungsstärke zweier Nebennieren eines Tieres gegeben (Belastungswert 3 für operativ entfernte NN, Belastungswert 5 für die zweite NN). Bei der nun folgenden Darlegung der erzielten Ergebnisse sollen die die operativ gewonnenen NN betreffenden histochemischen Verhältnisse mit "O 1", und die die anderen betreffenden mit "O 2" bezeichnet werden.

Ergebnisse dieser Reihe:

O 1-Nebennieren (operativ gewonnen): Sudanschnitte und doppeltbrechende Substanz lassen keine Entspeicherung erkennen. Mit der NAHD-Reaktion sieht man eine stets völlig freie Reticularis und eine meist ebenfalls ungefärbte untere Fasciculata (3/5). Dabei ließen die äußeren Rindenanteile, Zona glomerulosa und Zona fasciculata (äußerer Teil) eine kräftige und durchgehende Positivität erkennen. Lediglich in einem Fall fanden sich im Bereich der positiven Fasciculata einige größere Vakuolen. Die V i n e s - Färbung war in allen Fällen kräftig positiv (Wert 2-2,5) Wiederum fleckförmig im Bereich der mittleren und äußeren Fasciculata, in letzterer besonders innerhalb von Zellgruppen. Die Reticularis war weniger deutlich angefärbt und zeigte nur einzelne positive Zellen.

O 2-Nebennieren (nach einer Stunde gewonnen): Auch hier sind mit der Sudanfärbung und dem Nachweis der Doppelbrechung keine eindeutigen Ver-

änderungen nachzuweisen. Die NAHD-Reaktion dagegen zeigt eine deutliche Entspeicherung, und zwar in den äußeren Rindenbezirken (Glomerulosa und äußere Fasciculata). Auffallend ist eine etwas breitere Positivität nach innen zu, meist bis in die Reticularis hineinreichend. Besonders eindrucksvoll zeigt sich, daß im Bereich der entspeicherten und nur stellenweise ganz blaß anfärbbaren äußeren Rindenbezirke reichlich große Vakuolen vorhanden sind. Die V i n e s - Färbung weist ebenfalls deutliche Unterschiede zu den bei O 1 gefundenen Ergebnissen auf. Zwar finden wir sie in allen Fällen positiv, jedoch um mehr als die Hälfte weniger als bei den O 1-Schnitten (Wert 1-1,5). Positive Zellgruppen sind hier kaum vorhanden, lediglich Einzelzellen. (Fig. 5 u. 6, S.30).

Wir konnten also hierbei feststellen, daß die Entspeicherung beider Nebennieren eines Tieres durch verschieden starke Belastung zwar gleichen Ausmaßes war, aber verschiedene Rindenbezirke betraf (NAHD-Reaktion), und daß die Fuchsinophilie bei der akut, kurzdauernd belasteten NN um mehr als das Doppelte stärker war. Voraussetzung für diese Betrachtung ist selbstverständlich, daß man die funktionelle Kapazität der beiden Nebennieren eines Tieres als gleich groß annimmt.

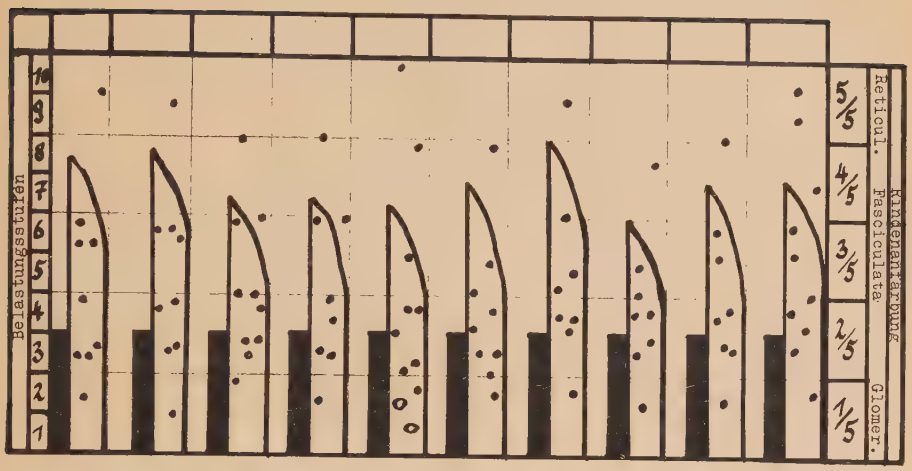
In der Literatur sind sehr reichlich Untersuchungen über einseitige Adrenektomie zu finden. Als Folge wird übereinstimmend die kompensatorische Vergrößerung der anderen NN beschrieben. S t i l l i n g , einer der ersten, die dieses Phänomen erkannten, führte einseitige Adrenektomie bei Kaninchen durch und sah weit über das Normale hinausgehende Größen- und Gewichtszunahme der NN. Auch hier handelt es sich jedoch um einen chronischen Stress, wenn man vom Operationsschock absieht, und dessen Kompensation bis zur Entfernung der zweiten NN als abgeschlossen betrachtet. Überdies stellt die Betrachtung einer kompensatorischen Hypertrophie keine Beziehungen zu Zellbildveränderungen histochemischer Art, wie sie einem akuten Stress folgen, her.

Die Zeit, innerhalb der eine kompensatorische Vergrößerung der NN eintreten kann, ist von W i n t e r und E m e r y für die Ratte mit 10 Tagen im Durchschnitt angegeben worden.

Histochemische Veränderungen bei einseitiger Adrenektomie werden berichtet von F l e x n e r und G r o l l m a n n , die eine "Enchosis" der fettfärberisch erfaßbaren Substanzen feststellten. Die Autoren verwendeten die Osmierung. T o n u t t i berichtet von gleichen Ergebnissen bei Meerschweinchen. Die hier zwischen der Gewinnung beider Nebennieren liegende Zeitspanne von Tagen ist jedoch relativ groß, so daß diese "Enchosis" wohl bereits eine Adaption darstellt.

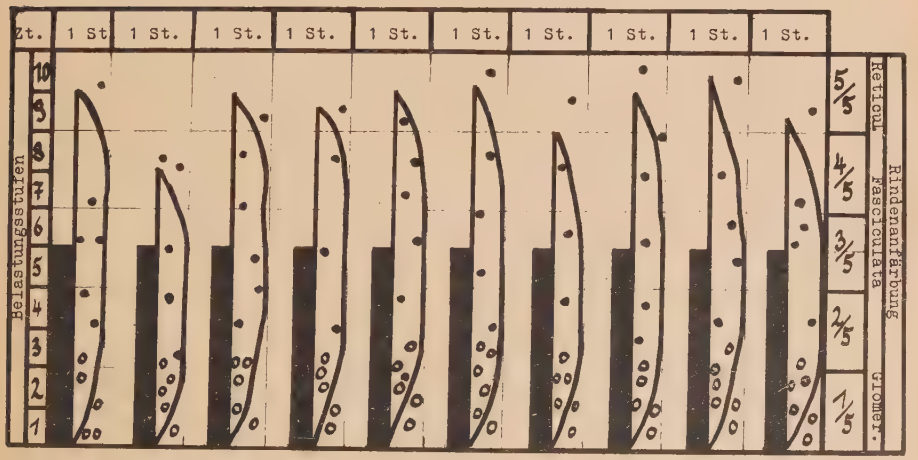
Figur 5

Operationstiere
(operativ entfernte Nebenniere)




Figur 6

10 Operationstiere
(nach 1 Stunde entnommene Nebenniere)




= Belastung

= NAHD-Reaktion

= Vines-Reaktion

= Vakuolen

Von C o v i a n wird eine Insuffizienz der verbliebenen Nebenniere zwischen 5. und 7. Tag nach der Operation berichtet. H a a s e stellt eine anfängliche Ascorbinsäureentleerung bei Meerschweinchen fest, während später eine Enchosis stattfindet.

Das Facit all dieser Ergebnisse bezogen auf den S e l y e - schen Adaptionsmechanismus müßte demnach lauten: Einer durch die akute Belastung (operative Entfernung der einen NN) der Reduzierung des funktionierenden NNR-Gewebes einsetzenden Diaprasie folgt in der Erholungs- und Resistenzphase eine Enchosis, morphologisch schließlich eine Vergrößerung und histologisch eine progressive Transformation (T o n u t t i) der im Körper verbleibenden NN. Mit unseren ganz akuten Versuchsanordnungen erfassen wir daher histochemisch ein ganz frühes Stadium dieses Vorgangs.

Auf die Wichtigkeit des Hypophysenvorderlappens soll gerade hier im Zusammenhang mit Adrenektomieversuchen anhangsweise kurz eingegangen werden. C o l l i p , A n d e r s o n und T h o m p s o n konnten zeigen, daß bei hypophysektomierten und gleichzeitig einseitig adrenektomierten Tieren keine kompensatorische Vergrößerung eintritt. Führt man andererseits adrenektomierten Tieren Rindenhormone zu, so bleibt die NN-Vergrößerung ebenfalls aus (I n g l e und K e n d a l l). Welche Bedeutung das ACTH und damit die Hypophyse hat, zeigt sehr eindrucksvoll das Ergebnis der Untersuchungen von Mc F a r l a n d . Der Autor adrenektomierte Ratten bilateral und hielt die Tiere durch Salzgaben noch längere Zeit am Leben. Während dieser Zeit bildeten sich aus dem Coelomepithel Nebennierenteile, die zwar nicht die typische Zonierung der Rinde aufwiesen, jedoch hormonell wirksam waren. Bei schweren pathologischen Stressformen konnte von T a y l o r , A l b e r t und S p r a g u e in reichlicher Menge ACTH im Blut nachgewiesen werden. So z. B. bei Tuberkulose, Toxinüberschwemmung des Blutes etc. Andererseits wiederum kommt es bei einem die Hypophyse zerstörenden Prozess zur Nebennierenatrophie. Ein weiterer Versuch von T a y l o r u. a. ist bemerkenswert: Die Autoren spritzten das Blut eines Patienten mit hypophysär bedingter adrenocorticaler Hyperplasie einer hypophysektomierten Ratte. Die nachfolgenden Untersuchungen an der Ratten-NN ergaben eine sehr deutliche Diaprasie.

Während zwar die Notwendigkeit einer wohlfunktionierenden Hypophyse für den Ablauf des Adaptionsgeschehens als unbedingt gesichert angesehen werden kann, ist der Weg, über den die Reaktion abläuft, noch keineswegs geklärt.

d) Psychische Belastung (emotioneller Stress).

Daß auch psychische Reize Veränderungen im Sinne eines Stress hervorrufen können, zeigten u. a. C o r n e l i u s und S c h u n k in ihren Arbeiten. Verff. konnten bei Katzen, welche durch die Anwesenheit von Hunden chronisch dosiert emotionell gestresst wurden, Organveränderungen auslösen, wie sie bei physischem Stress gesehen werden. Dabei war auch ein deutlicher Lipoidschwund in der NNR festzustellen.

Die von uns durchgeführten und im folgenden beschriebenen Versuche zur Auslösung eines emotionellen Stresses sind als akute Belastungen aufzufassen. Die Anordnung des Versuches war folgende: Ohne die Versuchsratte aus der gewohnten Umgebung ihres Stalles herauszunehmen, wurde eine ausgesprochen auf die Jagd weißer Ratten eingestellte Katze in den Stall hineingelassen. Dies sei erwähnt, weil es nicht leicht war, eine solche Katze zu finden. Durchaus nicht alle sogenannten "scharfen" Katzen sind gewillt, weiße Ratten zu jagen und zu töten. Mehrere als ausgesprochen geeignet empfohlene Katzen versagten hier ganz kläglich.

Der Versuch nahm nun dadurch meistens ein sehr schnelles Ende, daß die Katze der Ratte innerhalb von Sekunden das Genick durchbiß und ihr damit eigentlich jede Abwehraktion nahm. In einigen Fällen jagte jedoch die Katze eine Ratte aus dem Stall, um sie erst nach längerer Zeit - im Höchstfall 40 Minuten - zu töten. Dies ist sehr wichtig zu erwähnen, da hier dem sich zweifellos auch steigernden psychischen Stress sich eine akute, körperliche Belastung hinzugesellt, die nicht unterschätzt werden darf. Von einem absolut rein emotionellen Stress akuter Art zu sprechen, erscheint zunächst unmöglich, da das Tier ja auch getötet werden muß, die Tötungsart aber bereits Stressreaktionen auslösen kann (B a c h m a n n). Es addiert sich also dem Endergebnis zunächst ein unbekannter Faktor (Tötungsbelastung) dazu. Wie wir aus den anderen Versuchsreihen sehen konnten, lassen sich bei derartigen Belastungen histochemische Veränderungen nachweisen, und so werden sich hier auch psychischer und körperlicher Stress schließlich als histochemisches Endergebnis summieren.

Versucht man nun zusammenfassend eine Stress-Analyse an Hand eines Tieres dieser Reihe durchzuführen, so kommt man zu folgendem Ergebnis: 1. Emotioneller Stress vom Moment des Erkennens der entstandenen Konfliktsituation bis zum Augenblick des Todes.

2. Körperlicher Reiz durch entsprechend kurz- oder langdauernde Jagd und Abwehrversuche.

3. Tötungsbelastung.

Ad 1. Die Stärke des emotionellen Reizes stellt die gesuchte "Unbekannte" dar, sie soll aus dem histochemischen Endbild abgelesen werden.

Ad 2. Der unter 2) angegebene Stress verstärkt die Wirkung des ersten im Endbild, ganz besonders bei folgenden Verhältnissen: Geht der Versuch nicht innerhalb kurzer Zeit zu Ende, sondern handelt es sich regelrecht um eine "Jagd" oder einen "Kampf", dann vergrößert sich 2) um ein beträchtliches, steht aber in seiner Stärke in Abhängigkeit von Faktor 1. Je stärker die psychischen Wahrnehmungen sind, desto intensiver werden die Abwehrbewegungen sein. Bei den Ergebnissen solcher Fälle handelt es sich daher nicht um einen absoluten Wert, sondern um einen relativen und um ein durch Nebenbelastungen bzw. Folgebelastungen zu hoch ausgefallenes Ergebnis. Dies ist wohl wichtig zu bedenken, um der Überbewertung eines emotionellen Stresses im Vergleich zu "rein" körperlichen Stressarten aus dem Wege zu gehen, besonders deswegen, weil die emotionelle Belastungsart der Stärke und ihren Ergebnissen nach absolut an der Spitze steht.

Ad 3. Die dritte Teilkomponente, die Tötungsbelastung, bedarf bei dieser Versuchsreihe besonderer Erwähnung, da sie in gewisser Beziehung eine Parallele darstellt zur Tötungsart, die wir bei der Gewinnung von Normaltieren verwendeten. Bei den durch Schuß mit einem Luftgewehrbolzen durch das Gehirn getöteten Tieren vermuten wir eine möglichst niedrige Tötungsbelastung. Die Untersuchungen der durch Katzenbiß getöteten Ratten ergab, daß hier ebenfalls die Stammhirngegend durchtrennt war, nur noch viel intensiver, so daß man in manchen Fällen tatsächlich von einer totalen Durchtrennung dieser Hirnregion sprechen konnte. Auffallend war bei den einzelnen Versuchen, daß nach dem Biß - ganz ähnlich den Schußversuchen - mit einigen wenigen Krampfaktionen das Leben der Tiere zu Ende war. Es liegt deshalb nahe, in dem Durchschuß einerseits und dem Durchbiß andererseits eine gewisse Analogie zu sehen und beiden eine annähernd gleich große, gering anzusetzende Tötungsbelastung zuzuerkennen. Für unseren Versuch würde das bedeuten, daß die Tötungsbelastung im wesentlichen vernachlässigt werden kann. Bleibt nun auch noch durch eine recht kurze Zeit von Sekunden die oben veranschlagte körperliche Belastung sehr klein, so können die histochemisch gesehenen Veränderungen fast ausschließlich auf den psychisch-emotionellen Reiz zurückgeführt werden.

Wir hätten also hier einen nahezu reinen emotionellen Stress vor uns, vorausgesetzt, daß der Versuch sehr rasch verläuft und dem Tier keine Möglichkeiten größerer Flucht- und Abwehrbewegungen bleiben.

Ergebnisse dieser Reihe: Die Belastung wird hier dargestellt hauptsächlich durch die psychische Komponente, deren Einstufung schwierig ist. Sie wurde zunächst durch den Wert 2 charakterisiert bei rasch verlaufenden Fällen, und entsprechend höher bei länger dauernden Fällen. Zweimal liegt der Höchstwert einer Belastung "10" vor, einmal mit einer Dauer von 30 Minuten und einmal mit 45 Minuten.

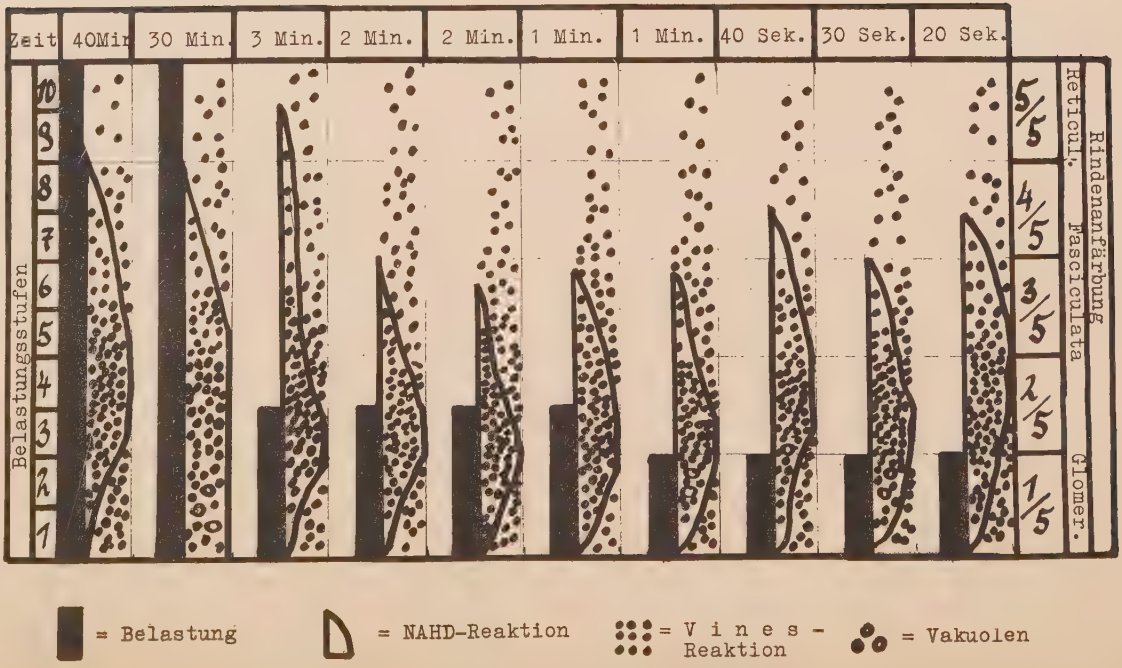
Sudanschnitte und Polarisation waren wiederum ganz unauffällig. Mit der NAHD-Reaktion sahen wir eine Entspeicherung in den äußersten und innersten Bezirken, aber nicht einheitlich, sondern in verschieden starkem Maße. Alle Fälle zeigen jedoch die stärkste Anfärbung im Bereich der äußeren Fasciculata und die schwächste innerhalb der Glomerulosa, inneren Fasciculata und Reticularis. Ein Fall (30 Minuten, Belastungswert 10) zeigt auch eine positive Glomerulosa. Die Verhältnisse der Entspeicherung sind am besten an Hand einer Tabelle einzusehen (s.Fig.7 S. 35). In 3 Fällen sahen wir innerhalb der angefärbten Partien deutliche große, sudanpositive Vakuolen.

Besonders eindrucksvoll zeigt sich, daß die V i n e s - Färbung in allen Fällen ungewöhnlich stark positiv ist. Wir finden teilweise die gesamte Rinde angefärbt, intensivst findet sich fuchsinophile Substanz in fast allen Zellen dieser Schnitte. Soweit nicht die gesamte Rinde betroffen ist, lassen sich doch ganze Zellsäulen der Fasciculata und die analogen Partien von Glomerulosa und Reticularis als stark positiv erkennen. Wir konnten hier in allen Fällen die Fuchsinophilie bereits ohne Mikroskop an den Schnitten erkennen. Dabei zeigte die Zona fasciculata die absolut stärkste Reaktion (Wert 4,5-5). Regressive und zirkulatorische Störungen, wie z. B. Blutungen und Nekrosen von Zellen, waren ebenfalls nachzuweisen, und zwar in 7 von 10 Fällen konnten wir Blutungen feststellen, und in 3 von 10 Fällen sahen wir einzelne Zellnekrosen. (s. Fig. 7 S. 35).

Akute Wirkung von Schreck- bzw. Schocksituationen untersuchten K r a c h t - S p a e t h e bei wilden Kaninchen. Sie konnten an der NNR keine Veränderungen feststellen, weder karyometrisch noch histologisch. Die Belastung soll hier ausschließlich die Schilddrüsen treffen, also einen thyreotropen Stress darstellen. Die Abnahme der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut als Ausdruck einer schweren Stress-Reaktion bei schwerer seelischer Belastung sahen S p e i e r s und M e y e r . Außerordentlich interessant sind die Versuche von R o t h l i n . Verf. erzeugte experimentell "psycho-neurogenic-hypertension" durch Lärmstress bei Ratten, indem er die Tiere dosiert den Geräuschen von Klingeln und Hupen aussetzte. Leider wurden hier

Figur 7

10 Psychisch belastete Tiere



nach unserem Wissen die NN nicht untersucht, sondern nur der Blutdruck, der eine recht deutliche Erhöhung zeigte. Vergleichen wir dieses Ergebnis mit denen von C o r n e l i u s und S c h u n k , die ja auch einen erhöhten Blutdruck und dazu eine Reaktion der NNR sahen, so kann unter Vorbehalt geschlossen werden, daß wohl auch bei R o t h l i n die NNR vom Stressgeschehen erfaßt wurde.

So konnten wir also bei vorwiegend emotionell ausgelöstem Stress mit der NAHD-Reaktion eine Entspeicherung der äußeren und inneren Rindenbezirke sehen, wobei sich die meiste positive Substanz noch im Bereich der äußeren Fasciculata fand. Die V i n e s - Färbung zeigte stärkste Ausmaße, wie wir sie bisher nur bei den Ertränkungsversuchen nachweisen konnten. Die Fuchsinophilie ist auch in den beiden Fällen so stark vorhanden, bei denen bis zum Tod der Ratte durch Jagd und Kampf längere Zeit verstrich.

Von C h w a l l a wird auf die Wichtigkeit der Nebennierenrinden-, bzw. Geschlechtshormone bei psychischen Störungen hingewiesen. Unsere Ergebnisse ziegen das Umgekehrte, nämlich die Wirkung psychischer Störungen auf den Aktivitätszustand der Nebennierenrinde.

## IV. Deutung der erzielten Ergebnisse

Da unsere Belastungsversuche durchwegs ganz akuter Art waren - mit Ausnahme einzelner chronischer Kontrollversuche - befaßten wir uns zunächst mit der Gewinnung eines "Normaltieres", um ein möglichst vollständig unbelastetes NNR-Bild zum Vergleich zu haben. Wir konnten an Hand der Sudan-Färbung und dem Nachweis der Doppelbrechung zunächst unsere "gelungenen Schußtiere" als Normalmaß annehmen, denn hier war eine vollständige Rindenanfärbung nachzuweisen. Daß auch die V i n e s - Färbung, also die fuchsinophile Substanz, in allen Fällen unter einer Minute Tötungszeit vollständig negativ war, spricht weiter für einen normalen Befund. L i e b e g o t t weist ja darauf hin, daß die hyalinen Tropfen als Ausdruck akut gesteigerter Hormonabgabe betrachtet werden müssen. Schließlich bedeutet die 4-5/5-Anfärbung mit der NAHD-Reaktion ebenfalls ein völlig normales histochemisches Ergebnis. (H e n i , G r u n e r , M a s t).

Im Gegensatz zu unseren Befunden beim Normaltier konnten wir bei der "Normaltiergewinnung" durch Äther oder Gas Abweichungen feststellen: Zwar zeigten Sudanreaktion und Doppelbrechung wiederum völlig gleiche Verhältnisse, doch ist bereits die V i n e s - Färbung in allen Fällen

positiv. Auch die NAHD-Reaktion läßt recht deutlich Entspeicherung erkennen. Man muß hier wohl schon einen adaptiven Versuch herauslesen. Als erste Belastungsreihe führten wir die mißlungenen Schußversuche an. Sudan und Polarisation sind ohne Auffälligkeiten. Fuchsinophile Substanz läßt sich in allen Fällen nachweisen. Hierbei konnten wir stärkemäßig jedoch keine manifeste Relation zur veranschlagten Belastung (3 oder mehr Schüsse, Zeitfaktor) finden. Der Stärkegrad schwankt nach unserer Einteilung zwischen 3 und 3,5. Die NAHD-Reaktion läßt deutliche Entspeicherung erkennen, aber nur teilweise umgekehrt proportional zur Belastung. Beide Reaktionen sind offenbar viel beweglicher und empfindlicher als man geneigt ist anzunehmen. So finden wir im Falle einer höchsten Belastungsstufe eine fast vollständig negative NAHD-Reaktion, dagegen bei einer Belastungsstufe von 6 einmal eine 3/5, ein anderes Mal eine 1/5 Anfärbung der Rinde. Daß jedoch die wenn auch verschiedene Entspeicherung eine Aktivitätsänderung bedeutet, das wird bekräftigt durch das Auftreten von Vakuolen.

Die Reihe der Schwimmversuche zeitigte - auch in einem chronischen Falle - bei Sudan und Polarisation keine Ergebnisse einer veränderten Aktivität. Die vorhandene Entspeicherung der aktiven Carbonylgruppen einerseits, die mäßig reichliche fuchsinophile Substanz andererseits weisen eher auf eine Aktivitätsänderung in Folge der Tötung (durch Gas) hin. Eindrucksvoll zeigt sich bei den Ertränkungsfällen - schwerer akuter Stress - eine stärkste Fuchsinophilie vom Grade 4-4,5. Dabei läßt sich die sehr breite NAHD-Reaktion (4-5/5) nur schwer, vielleicht als letztes "präadaptives" Stadium deuten.

Bei den Operationstieren erkennen wir bei unveränderter Sudanfärbung und Polarisation eine unterschiedliche V i n e s - Intensität der beiden Reihen. Der mittelstarke (2-2,5) Gehalt an fuchsinophiler Substanz der operativ entfernten NN zeigt uns die Reaktion auf einen akuten Stress. Hier finden wir mehr Fuchsinophilie als bei durch Gas gewonnenen Normaltieren, der Operationsschock findet darin offenbar seinen Ausdruck. Die in der Stärke um die Hälfte verminderte Fuchsinophilie der zweiten NNR erklärt sich durch das nunmehr abklingende akute Geschehen und den Beginn der Adaption. Während die NAHD-Reaktion der operativ gewonnenen NNR eine deutliche zentrale Entspeicherung aufweist, sehen wir bei den zweiten NNR auch eine Diaprasie in Glomerulosa und äußerer Fasciculata mit Auftreten von Vakuolen. Dabei reicht die Anfärbung weiter nach innen und erstreckt sich bis in die Reticularis. Gewißermaßen haben wir hier eine "Verschiebung" der an sich gleich starken (beide NNR 3/5) Positivität nach innen. In der Literatur findet sich bei H a r r i s o n und

und C a i n ein ähnliches Bild für die Sudanfärbung. Die Autoren versuchten einen Cyclus aufzubauen aus den Ergebnissen von 6 Ratten, die an 6 aufeinander folgenden Tagen getötet wurden.

Die psychisch belastete Tierreihe läßt mit der Sudanfärbung und der Polarisation ebenfalls keine Veränderungen erkennen. Auch hier ist die Zeit offenbar zu kurz für eine Reaktionsmöglichkeit dieser etwas trägen Nachweismethoden. Die Bedeutung dieser Belastung liegt nach unseren Ergebnissen ziemlich hoch: So zeigt die V i n e s - Färbung die stärksten überhaupt nachgewiesenen Grade (4,5-5). Dabei sahen wir NN-Schnitte, bei denen die gesamte Rinde fuchsinophil war. Der Ausfall der Reaktion war in allen Fällen so kräftig und eindeutig, daß man den Grund hierfür wohl nicht nur im "Akuten" (L i e b e g o t t) suchen darf, sondern dem psychischen Faktor dieser Reihe ganz besondere Beachtung schenken muß. Es bestehen hier starke Parallelen mit den bei den Ertränkungsfällen gesehenen Verhältnissen, die ja auch aus akuten und psychischen Stresskomponenten heraus gedeutet werden müssen. Auch die NAHD-Reaktion weist starke Verschiebungen auf: Entspeicherung in den äußeren und inneren Bezirken verschiedenen Grades. Der Gipfelpunkt der Anfärbung liegt dabei in jedem Falle im Bereich der äußeren Fasciculata, hier treten aber auch einzelne Vakuolen auf. Das Gesamtbild der NAHD-Reaktion ähnelt hier stark dem der zweiten NNR bei den Operationstieren, nur vermissen wir hier die Gleichmäßigkeit der Rindenpositivität, die wir bei der Op-Reihe sahen.

Vergleichen wir nun die einzelnen Versuchsreihen und ihre Belastungen und Ergebnisse, so müssen wir erkennen, daß die anfangs angenommene Belastungsstärke vielfach nicht den gefundenen Aktivitätsänderungen entspricht. So ergibt sich aus den histochemischen Ergebnissen als die stärkste angewandte Stressart

1. der Psychische Stress.

Es folgen der Schwere der Belastung nach:

2. Nicht gelungene Schußtiere
3. O 1 - Tiere (operierte NN)
4. "Normaltiere" (durch Äther oder CO getötet)
5. O 2 - Tiere (nach 1 Stunde entfernte NN)
6. Schwimmtiere
7. Normaltiere (gelungene Schußtiere).

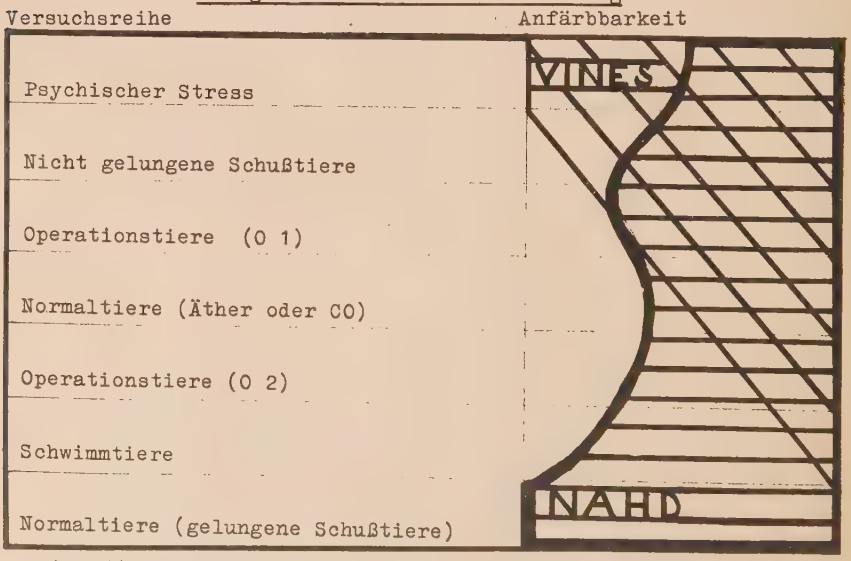
Diese Einteilung stützt sich auf die Färbung nach V i n e s der fuchsinophilen Substanz und auf den Ausfall der NAHD-Reaktion nach A s h b e l und S e l i g m a n . Während die fuchsinophile

Substanz vom Normaltier (Wert 0) bis zum schwersten akuten psychischen Stress (Wert 4,5-5) ansteigt, ist der Ausfall der NAHD-Reaktion nicht so leicht zu beurteilen. Die NAHD reagiert offenbar so rasch, daß es schwer ist, analoge Stadien verschiedener Tiere bei gleicher Belastung zu treffen. Akute Belastungen zeigen in jedem Falle eine Entspeicherung, meist der inneren Rindenbezirke. Daneben tritt auch Entspeicherung der äußeren Rinde bei den Reihen des psychischen Stress auf, ferner bei der 0-2 Reihe und vereinzelt in anderen Reihen. Daß die NAHD schneller reagiert als die V i n e s - Färbung sahen wir an Schußtieren unter einer Minute, bei denen aber 2 Schüsse nötig waren: Hier ist die V i n e s - Färbung noch völlig negativ (Bedeutung eines Normaltieres), die NAHD-Reaktion weist aber bereits deutliche Entspeicherung auf.

An Hand einer zusammenfassenden Skizze sollen nun noch einmal die färberischen Ergebnisse aller Versuchsreihen den entsprechenden Belastungen gegenübergestellt werden.

Hierbei wurden nur die Färbung der fuchsinophilen Substanz nach V i n e s und die NAHD-Reaktion nach A s h b e l und S e l i g m a n berücksichtigt.

G e g e n ü b e r s t e l l u n g




Aus dieser Skizze ergibt sich nun, daß eine stark positive V i n e s - Färbung eine weniger starke NAHD-Reaktion aufweist und umgekehrt. Die beiden Reaktionen zeigen also im Rahmen einer stärkemäßig gestaffelten Belastungsreihe umgekehrt proportionales Verhalten in der

Rattennebennierenrinde. Zu dem gleichen Ergebnis kam D h o m bei den histochemischen Untersuchungen an den Hiluszellen des Ovars.

## V. Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wird über die histochemischen Veränderungen in den Nebennierenrinden von 57 Albinoratten berichtet, die vorwiegend akuten Belastungen ausgesetzt wurden. Besonderes Gewicht wurde dabei auf die Gewinnung des "Normaltieres" gelegt. Aufgrund der Ergebnisse konnte folgendes festgestellt werden:

1. Normale Ratten-NNR zeigen negative V i n e s - Reaktion und eine nahezu vollständige Anfärbung mit der NAHD-Reaktion von A s h b e l und S e l i g m a n (Schußtiere).

Durch Äther oder CO-Tötung gewonnene "Normaltiere" lassen bereits Zeichen eines akuten Stress erkennen.

2. Nur Minuten dauernder Stress führt zum Auftreten fuchsinophiler Substanz, besonders in den äußeren Teilen der Ratten-NNR, und zur Entspeicherung der aktiven Carbonylgruppen in verschiedenen Zonen der Rinde.

3. Schon bei nur einer Stunde Stress-Dauer wird die Fuchsinophilie allmählich schwächer. Die NAHD-Reaktion zeigt eine nicht gleichmäßige Verschiebung der entspeicherten Zonen. Stets bleibt jedoch die Positivität der äußeren Fasciculata erhalten.

4. Die psychische Belastung stellt einen außerordentlich schweren Stress dar (Tötung durch Katze, Ertränkungsfälle). Es ist daher wichtig, psychische Momente bei allen Versuchsreihen - insbesondere bei der Gewinnung von Normaltieren - auszuschalten.

5. Nicht unter "Zwang" stehende Belastungsversuche (Schwimmversuche) unterliegen dem Adaptionsvermögen der Tiere.

6. Die Färbung der fuchsinophilen Substanz nach V i n e s ist geeignet, Aktivitätsänderungen in der NNR bei akuten, insbesondere bei psychischen Belastungen anzuzeigen. Offenbar steht sie am Anfang der Alarmphase (S e l y e) und schwindet allmählich mit zunehmender Adaption.

7. Die NAHD-Reaktion nach A s h b e l und S e l i g m a n zeigt bereits geringste Belastungen in der NNR von Ratten an. Die

auftretende Entspeicherung läßt in den Gruppen bei hochakuter Belastung keine Gruppen-Relationen zu den Belastungen erkennen. Bei länger dauernden Stressarten sind diese Relationen schon eher vorhanden. Die Reaktion ist empfindlicher als die V i n e s - Reaktion.

8. Beide Reaktionen zeigen in der Ratten-NNR umgekehrt proportionales Verhalten bei einer stärkemäßig gestaffelten Belastungsreihe.

9. Sudanfärbung und Polarisation zeigen bei hochakuten Belastungen keine Veränderungen, sie sind nicht geeignet, Aktivitätsänderungen in der NNR aufzuweisen.

Herrn Privatdozenten Dr. D h o m bin ich außerordentlich dankbar für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates. Besonderer Dank gilt der mannigfachen Unterstützung, mit der er mir bei der Durchführung der Arbeit stets zur Seite stand.

Herrn Professor Dr. K i r c h danke ich herzlichst für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Rattennebennierenrinde. Zu dem gleichen Ergebnis kam D h o m bei den histochemischen Untersuchungen an den Hiluszellen des Ovars.

## V. Z u s a m m e n f a s s u n g

Es wird über die histochemischen Veränderungen in den Nebennierenrinden von 57 Albinoratten berichtet, die vorwiegend akuten Belastungen ausgesetzt wurden. Besonderes Gewicht wurde dabei auf die Gewinnung des "Normaltieres" gelegt. Aufgrund der Ergebnisse konnte folgendes festgestellt werden:

1. Normale Ratten-NNR zeigen negative V i n e s - Reaktion und eine nahezu vollständige Anfärbung mit der NAHD-Reaktion von A s h b e l und S e l i g m a n (Schußtiere).

Durch Äther oder CO-Tötung gewonnene "Normaltiere" lassen bereits Zeichen eines akuten Stress erkennen.

2. Nur Minuten dauernder Stress führt zum Auftreten fuchsinophiler Substanz, besonders in den äußeren Teilen der Ratten-NNR, und zur Entspeicherung der aktiven Carbonylgruppen in verschiedenen Zonen der Rinde.

3. Schon bei nur einer Stunde Stress-Dauer wird die Fuchsinophilie allmählich schwächer. Die NAHD-Reaktion zeigt eine nicht gleichmäßige Verschiebung der entspeicherten Zonen. Stets bleibt jedoch die Positivität der äußeren Fasciculata erhalten.

4. Die psychische Belastung stellt einen außerordentlich schweren Stress dar (Tötung durch Katze, Ertränkungsfälle). Es ist daher wichtig, psychische Momente bei allen Versuchsreihen - insbesondere bei der Gewinnung von Normaltieren - auszuschalten.

5. Nicht unter "Zwang" stehende Belastungsversuche (Schwimmversuche) unterliegen dem Adaptionsvermögen der Tiere.

6. Die Färbung der fuchsinophilen Substanz nach V i n e s ist geeignet, Aktivitätsänderungen in der NNR bei akuten, insbesondere bei psychischen Belastungen anzuzeigen. Offenbar steht sie am Anfang der Alarmphase (S e l y e) und schwindet allmählich mit zunehmender Adaption.

7. Die NAHD-Reaktion nach A s h b e l und S e l i g m a n zeigt bereits geringste Belastungen in der NNR von Ratten an. Die

auftretende Entspeicherung läßt in den Gruppen bei hochakuter Belastung keine Gruppen-Relationen zu den Belastungen erkennen. Bei länger dauernden Stressarten sind diese Relationen schon eher vorhanden. Die Reaktion ist empfindlicher als die V i n e s - Reaktion.

8. Beide Reaktionen zeigen in der Ratten-NNR umgekehrt proportionales Verhalten bei einer stärkemäßig gestaffelten Belastungsreihe.

9. Sudanfärbung und Polarisation zeigen bei hochakuten Belastungen keine Veränderungen, sie sind nicht geeignet, Aktivitätsänderungen in der NNR aufzuweisen.

Herrn Privatdozenten Dr. D h o m bin ich außerordentlich dankbar für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates. Besonderer Dank gilt der mannigfachen Unterstützung, mit der er mir bei der Durchführung der Arbeit stets zur Seite stand.

Herrn Professor Dr. K i r c h danke ich herzlichst für die freundliche Übernahme des Korreferates.

## S c h r i f t t u m


| | |
|---|---|
| Ashbel, R. u. A. M. Seligman | Endokrinology 44, 656 (1949) |
| Adams, E. u. M. Baxter | Arch.Path. 48, 13 (1949) |
| Bachmann, R. | Hdb.d.mikroskop.Anat.VI (1954) |
| | Verh.Dtsch.Ges.Path. 68 (1952) |
| Benett, H.S. | Amer.J.Anat. 67, 51 (1940) |
| Benett, H. S., Reichstein, T u.Frazao | zit. nach Bachmann |
| Blackman, S. | zit. nach Zinsser |
| Bourne, G. H. | Cytology and cell-physiology Oxford 1942 |
| | Proc.Linnean.Soc.N.S.Wales 61, 221 (1936) zit.nach Bachmann |
| Collip, J.B., Anderson, E. M. und D. L. Thompson | Lancet I, 347 (1933) |
| Cornelius, H. V. u. J. Schunk | Zt.f.ges.exp.Med.117,497 (1951) |
| | Zt.f.ges.exp.Med.120,101 (1952) |
| Covian, M. R. | Rev.Soc.Argent.Biol.22,383 (1946) |
| Chwalla, R. | Die Überfunktion der Nebenniere (Verlag f.med.Wissenschaften 1955) |
| Dean, H. W. | Adrenal Function in infants and children (Grune et Stration 1956) |
| Dean,H.W., Shaw, I. H., Rogers and Williams | zit.nach Bachmann |
| De Jongh, S.E. u.W. Rosenthal | Acta.brev.neerland 3, 86 (1933) |
| Dempsey u. Wislocki | zit.nach Ashbel und Seligman |
| Dhom, G. | Ztschr.f.Geb.u.Gyn.142 (1954/55) |
| Dhom, G. | 40.Pathologentagung in Düsseldorf 1956 |
| Dolfini, G. | zit. nach Bachmann |
| Eger, W. | Virchows Arch.309,811 (1942) |
| Eger, W., Gottesleben u. Tietjen | Virchows Arch.324,173 (1953/54) |
| Elliot, T.R. u. Tuckett, J. L. | J.of Physiol. 34, 332 (1906) |
| Feldmann, J. D. | Anat.Rec. 109, 41 (1951) |
| | Anat.Rec. 107,347 (1950) |
| | Endokrinology 46, 552 (1950) |
| Flexner, L.B. u. A. Grollmann | Anat.Rec. 75, 207 (1939) |
| Frazao, J. V. | zit. nach Bachmann |
| Gaarenstroom, J. J., Waterman, L. u. L. Laqueur | Acta brev.neerland 1, 10 (1937) |
| Gomori, G. | Proc.Soc.Exper.Biol.a.Med.51,133 (1942) |
| | Microscopic.Histochemistry Verlag:The University of Chicago-Press (1952) |

| | |
|---|---|
| Haase, I. | Endokrinology 29, 1 (1952) |
| Harrison,R.G. u. A.J. Cain | J.of Anat. 81, 286 (1947) |
| Heni, F., Gruner, P. und H. Mast | Verh.Dtsch.Ges.Path.176 (1952) |
| Hoff, F. | Klin.Physiol.u.Path. Thieme-Verlag Stuttgart 1952 |
| Hort, W. | Virchows Arch. 320, 197 (1951) |
| Ingle, D. G. und E.C. Kendall | zit.nach Bachmann |
| Knouff, R. A., Brown, J. B. und B. M. Schneider | Anat.Rec. 79, 17 (1941) |
| Kolmer, W. | Arch.Mikr.Anat. 91, 1 (1918) |
| Krachth, I. u. M. Spaethe | Virchows Arch. 324, 83 (1953/54) |
| Liebegott, G. | Verh.Dtsch.Ges.Path.21 (1952) |
| Lison, L. | zit.nach Bachmann |
| Mc.Farland, W. E. | Anat.Rec. 93, 233 (1945) |
| Murray, H.C. u. A. F. Morgan | J.of Biol.Chem. 163, 401 (1946) |
| Rather, L. J. | J. Exper.Med. 93, 573 (1951) |
| Ratsimamanga, A. | J.de Physiol. 81, 42 (1950) |
| Reichstein,T.,Wintersteiner,O. u. C.W. Shopee | zit. nach Hoff |
| Romeis, B. | Mikroskopische Technik 1948 Leibniz-Verlag |
| Rothlin, E. | zit.nach Intern.Congr.of Intern Med Stockholm 1954 |
| Selye, H. | "Stress",Acta Inc. Montreal (1950) |
| | Einführung in die Lehre vom Adaptionssyndrom (1953), Thieme Verlag |
| Speiers, R. S. u. E. K. Meier | Endokrinology 45, 403 (1949) |
| | Endokrinology 48, 316 (1951) |
| Steege, H. | Frkf.Z.Path. 63, 209 (1952) |
| Stilling, H. | Virchows Arch. 118, 569 (1889) |
| Stöhr, Ph. | Lehrbuch d. Histologie 1951 Springer-Verlag |
| Swingle, W.W., Pfiffner,J.J.u.Hartmann | zit.nach Hoff |
| Taylor,A.B.,Albert u. R.G.Sprague | Endokrinology 45,335 (1949) |
| Tonutti, E. | Verh.Dtsch.Ges.Path.123, 1952 |
| Verzàr, F. | Die Funktion der Nebennierenrinde Verlag Benno Schwabe-Basel |
| Vincent, S. | zit.nach Bachmann |
| Vines, H. W. C. | J.Path. 40, 161 (1935) |
| Walraff, J. | Z.Zellforsch.34,362 (1949) |
| Weaver,H.M.,Nelson,W.O.,Dean,H.W.u.I.H.Shaw | zit.nach Bachmann |
| Weaver,H.M. u. W.O. Nelson | Anat.Rec.85,51 (1943) |
| Winter,C.A. und F.E. Emery | Anat.Rec. 66, 401 (1936) |
| Yoffey, I.M. und I.S.Baxter | J. of Anat. 81, 335 (1947) |
| Zinsser, A. D. und Zinsser, H.H. | Arch.of Path. 51, 393 (1951) |

# L e b e n s l a u f

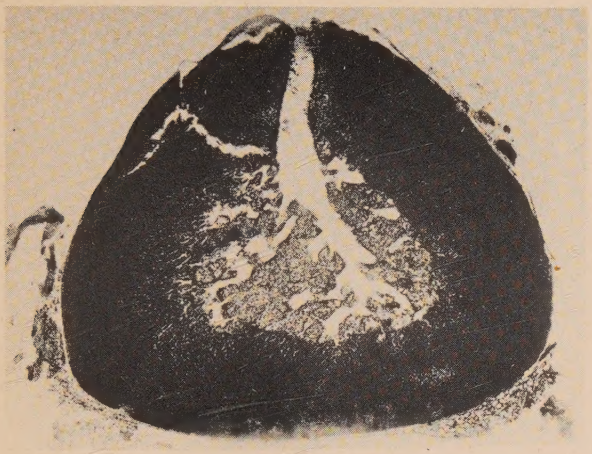
Am 2. 9. 1926 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Otto Arthur E n g e l m a n n und seiner Ehefrau Johanna, geb. Andreas in Leipzig geboren. Im Jahre 1931 verzogen wir nach Chemnitz. Dort absolvierte ich 4 Klassen Volksschule und trat dann in das humanistische Gymnasium ein. Im Frühjahr 1943 wurde ich nach Ablegen eines Not-Abiturs zur Wehrmacht eingezogen. 1945 konnte ich nach zweitägiger russischer Kriegsgefangenschaft heimkehren und stellte mich dem Chemnitzer Küchwaldkrankenhaus als Krankenpfleger zur Verfügung. Nach vierteljährigem Pflegedienst stellte mich der Kinderfacharzt Dr. med. O. Köhler als Sprechstundenhilfe in seiner Praxis ein. Im Jahre 1947 legte ich schließlich noch die vollgültige Reifeprüfung am Chemnitzer Gymnasium ab und begann 1948 mit dem medizinischen Studium in Würzburg. Nach Ablegen des Vorphysikums 1949 und des Physikums 1951 bestand ich im Sommer 1954 die ärztliche Prüfung. Am 1. Oktober 1954 trat ich als Pflichtassistent in das Pathologische Institut Würzburg ein, in welchem ich noch heute arbeite.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Egon Engelmann

# Anhang



Nebennierenrinde eines Normaltieres (Zeitfaktor 3o Sekunden, 1 Schuß) bei Nachweis der aktiven Carbonylgruppen mit der NAHD-Reaktion: Alle 3 Zonen der Rinde sind angefärbt, der Schwerpunkt liegt in der äußeren Fasciculata.

Nebennierenrinde eines psychisch gestressten Tieres ( Zeitfaktor 2 Minuten ) bei Nachweis der aktiven Carbonylgruppen mit der NAHD-Reaktion: Weitgehende Entspeicherung der Glomerulosa, inneren Fasciculata und Reticularis. Die Anfärbung ist beschränkt auf das Gebiet der äußeren Fasciculata.

RUDOLF BAENR DRUCK- UND WERBETECHNIK
WUERZBURG POLOFFSTRASSE 3